



# Rôle des récepteurs kainate dans la transmission synaptique:une étude dans l'hippocampe de rat contrôle et dans un modèle animald'épilepsie du lobe temporal

Jérôme Epsztein

## ► To cite this version:

Jérôme Epsztein. Rôle des récepteurs kainate dans la transmission synaptique:une étude dans l'hippocampe de rat contrôle et dans un modèle animald'épilepsie du lobe temporal. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Provence - Aix-Marseille I, 2006. Français. NNT: . tel-00118689

**HAL Id: tel-00118689**

**<https://theses.hal.science/tel-00118689>**

Submitted on 6 Dec 2006

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITE DE PROVENCE

AIX-MARSEILLE I

Faculté des Sciences de Saint-Charles

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE AIX-MARSEILLE I

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

**Jérôme EPSZTEIN**

le 9 décembre 2005

Titre :

**Rôle des récepteurs kainate dans la transmission synaptique :  
une étude dans l'hippocampe de rat contrôle et dans un modèle animal  
d'épilepsie du lobe temporal**

Composition du jury :

Président :

Pr. B. Soumireu-Mourat

Rapporteurs :

Dr. R. Miles

Dr. L. Fagni

Examineurs :

Pr. J. Lerma

Dr. Y. Ben-Ari

Dr. V. Crépel

## **Remerciements :**

Le travail réalisé au cours de cette thèse a été réalisé à l'Institut de Neurobiologie de la méditerranée, INSERM Unité 29 dirigée par le Dr Yehezkel Ben-Ari. Je le remercie pour m'avoir offert la possibilité de travailler dans son laboratoire, pour son aide constante, pour son enthousiasme scientifique et pour la confiance qu'il m'a accordée. Je le remercie également pour m'avoir permis de travailler dans ce magnifique bâtiment dont j'ai pu suivre la conception et la réalisation au cours de ces années de thèse.

Je remercie le Pr. Bernard Soumireu-Mourat de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je remercie le Dr. Laurent Fagni et le Dr. Richard Miles d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et le Pr. Juan Lerma d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. Valérie Crépel qui a encadré ce travail de thèse pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour toutes nos discussions et toutes les belles émotions scientifiques partagées. Ces années passées en sa compagnie resteront toujours très importantes pour moi.

Je remercie également toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail : Rosa Cossart, Hélène Becq, June Hirsch, Isabel Jorquera, Alfonso Represa, Alain Ribas, Roman Tyzio. J'ai une pensée particulière pour le Dr. Rosa Cossart qui a toujours été à mes côtés et m'a toujours soutenu et aidé dès les tout premiers moments.

Lorsque je suis arrivé dans ce laboratoire le Dr. Ben-Ari m'a dit que c'était « une grande famille » et c'est effectivement ce que j'ai ressenti pendant ces années. Je voudrais ici en remercier tous les membres présents et passés. Ils ont tous contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je remercie également les membres de ma famille, mes frères et sœurs Lise, Thomas et Hélène, ma mère et mes deux grands-mères. Je sais que je leur manque et ils me manquent aussi.

Je remercie enfin Charlotte pour son soutien sans faille et sa compréhension pendant la rédaction de ce manuscrit.

*Je souhaite dédier cette thèse à la mémoire de mon grand-père Joseph Epsztein.*

## Résumé :

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central. Il agit sur trois grands types de récepteurs ionotropiques, les récepteurs AMPA, NMDA et kainate. Les récepteurs AMPA sont les principaux médiateurs de la transmission synaptique excitatrice dans le système nerveux. Récemment, ce rôle a également été attribué aux récepteurs kainate mais dans des conditions d'activation synaptique intense lorsque de grandes quantités de glutamate sont libérées. La question s'est alors posée de savoir si ces récepteurs participaient à la transmission synaptique excitatrice dans des conditions d'activité plus physiologiques.

La première partie de ce travail a consisté à réexaminer les conditions d'activation des récepteurs kainate post-synaptiques dans les cellules pyramidales de la région CA3 et dans les interneurons de la région CA1 de l'hippocampe de rat contrôle. Nos résultats montrent que les récepteurs kainate peuvent être activés par de faibles quantités de glutamate libéré dans ces deux types cellulaires. Nos quantifications révèlent que, dans ces conditions de faible libération de glutamate, leur participation à la transmission synaptique excitatrice est très significative. Nous montrons également que dans les cellules pyramidales de CA3 les récepteurs AMPA et KA sont spécifiquement co-activés au niveau post-synaptique au niveau des fibres mossues en provenance des cellules granulaires.

Un bourgeonnement pathologique des fibres mossues est observé dans les modèles animaux et chez les patients atteints d'épilepsie du lobe temporal, une des formes les plus fréquentes d'épilepsie chez l'homme. Après bourgeonnement, les fibres mossues viennent former des synapses aberrantes sur les cellules granulaires. Dans une seconde partie de ce travail nous nous sommes demandés si ce bourgeonnement pouvait modifier la transmission synaptique portée par les récepteurs kainate dans les cellules granulaires dans un modèle animal d'épilepsie du lobe temporal. Nos résultats montrent que, contrairement aux cellules granulaires de rats contrôles, la transmission synaptique excitatrice passe par l'activation de récepteurs kainate dans les cellules granulaires d'animaux épileptiques chroniques. Nos quantifications montrent que dans ces cellules la transmission synaptique portée par les récepteurs kainate est très significative et est directement liée au bourgeonnement des fibres mossues caractéristique des épilepsies du lobe temporal.

En conclusion, ces travaux montrent le rôle important des récepteurs kainate dans la transmission synaptique dans des conditions physiologiques. Nos travaux montrent également que la plasticité post-lésionnelle peut induire une transmission synaptique aberrante portée par l'activation des récepteurs kainate dans un modèle animal d'épilepsie du lobe temporal.



## **TABLE DES MATIERES :**

### **Introduction générale P. 5**

### **Chapitre I: Anatomie de la formation hippocampique P. 9**

- I.1. Principaux types cellulaires de la formation hippocampique p. 13
- I.2. Organisation cytologique des cellules principales de la formation hippocampique p. 15
- I.3. Les interneurons de la formation hippocampique p. 26
- I.4. Principales afférences et efférences de la formation hippocampique p. 34

### **Chapitre II: Transmission synaptique glutamatergique P. 36**

- II.1. Synthèse, libération et recapture du glutamate p. 37
- II.2. Les récepteurs post-synaptiques au glutamate p. 47
  - II.2.1. Les récepteurs ionotropiques p. 47
  - II.2.2. Les récepteurs métabotropiques p. 61

### **Chapitre III : Les récepteurs kainate P. 66**

- III.1. Diversité moléculaire des récepteurs kainate p. 68
- III.2. Pharmacologie des récepteurs kainates p. 71
- III.3. Structure des récepteurs kainate : implications fonctionnelles p.75
- III.4. Adressage des récepteurs kainates à la membrane et régulation p. 79
- III.5. Propriétés fonctionnelles des récepteurs kainate dans les systèmes hétérologues p. 80
- III.6. Les récepteurs kainate natifs p. 90
  - III.6.1. Propriétés fonctionnelles unitaires des récepteurs kainate natifs p.92
  - III.6.2. Distribution des récepteurs kainate natifs dans la formation hippocampique p. 93
  - III.6.3. Rôle physiologique des récepteurs kainate dans l'hippocampe p. 97
  - III.6.4. Etude des récepteurs kainate natifs dans d'autres régions du système nerveux p. 113

### **Chapitre IV : Récepteurs kainate et épilepsie du lobe temporal P. 119**

- IV.1. Les épilepsies du lobe temporal p. 121
- IV.2. Récepteurs kainate et épilepsie du lobe temporal p. 124
- IV.3. Modèles animaux d'épilepsie chronique du lobe temporal p. 127

### **-Article 1- P. 135**

### **-Article 2- P. 140**

### **Discussion générale P. 152**

### **Références Bibliographiques P. 167**

## Introduction générale

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central. Il agit sur deux grandes familles de récepteurs, les récepteurs ionotropiques qui sont des récepteurs canaux transmembranaires dont l'ouverture est directement conditionnée par la fixation de glutamate et les récepteurs métabotropiques qui, après fixation de glutamate, modifient l'ouverture de canaux ioniques par l'intermédiaire de protéines G. On a caractérisé trois grandes familles de récepteurs ionotropiques au glutamate sur la base de critères pharmacologiques puis moléculaires. La caractérisation pharmacologique de ces récepteurs repose sur la mise en évidence de molécules exogènes se fixant préférentiellement sur chaque type de récepteur. Ces molécules ont donné leurs noms à ces récepteurs ainsi distingue-t-on les récepteurs AMPA, les récepteurs NMDA et les récepteurs kainate. Les récepteurs AMPA et NMDA ont rapidement été localisés au niveau post-synaptique de la plupart des synapses du système nerveux central. A ce niveau, les récepteurs AMPA sont les principaux médiateurs de la transmission synaptique rapide tandis que les récepteurs NMDA, activés dans des conditions plus particulières, interviennent dans la plasticité de l'efficacité de la transmission synaptique.

Contrairement aux progrès rapides concernant le rôle des récepteurs AMPA et NMDA, le développement des connaissances concernant le rôle des récepteurs kainate dans le système nerveux a été plus tardif. Les récepteurs AMPA et kainate ont pendant longtemps été regroupés fonctionnellement sous le terme de récepteurs AMPA/KA car aucune molécule ne permettait alors de bloquer sélectivement l'un ou l'autre de ces récepteurs. La synthèse de telles molécules et leur utilisation dans des préparations relevantes physiologiquement ont permis, dans les cinq années qui ont précédé le début de ce travail de thèse, de faire des progrès très rapides et de révéler un rôle pour des récepteurs kainate post-synaptiques dans la transmission synaptique glutamatergique. Cependant, ces premières études révélèrent également que les conditions d'activation des récepteurs AMPA et kainate post-synaptiques sont sensiblement différentes : alors que les récepteurs AMPA sont facilement activés par le glutamate libéré suite à l'arrivée d'un potentiel d'action, l'activation des récepteurs kainate nécessite la libération de glutamate en grande quantité suite à l'arrivée de plusieurs potentiels d'actions se succédant à haute fréquence ou à la libération conjointe de glutamate au niveau d'un grand nombre de synapses. L'activation de ces deux types de récepteurs a également des conséquences différentes au niveau post-synaptique : alors que l'activation des récepteurs AMPA entraîne une dépolarisation importante et rapide de la cellule post-synaptique, la dépolarisation induite par l'ouverture des récepteurs kainate est beaucoup plus faible et plus

lente. Comme les caractéristiques fonctionnelles des récepteurs AMPA et kainate connues à l'époque n'était pas sensiblement différentes, l'hypothèse la plus simple était que ces deux récepteurs différaient principalement par leur localisation au niveau post-synaptique: les récepteurs AMPA seraient situés au niveau post-synaptique en face du site de libération du glutamate tandis que les récepteurs kainate seraient situés plus loin, en périphérie des synapses. Cette hypothèse permettait d'expliquer l'activation rapide et massive des récepteurs AMPA suite à la libération de glutamate dans la fente synaptique, et la nécessité d'une libération plus importante de glutamate pour permettre une diffusion en dehors de la fente synaptique et l'activation des récepteurs kainate.

La première partie de ce travail de thèse a consisté à réexaminer les conditions d'activation des récepteurs kainate post-synaptiques dans les types cellulaires où cette activation avait été décrite pour la première fois. Nos travaux ont permis de déterminer que les récepteurs kainate dans ces types cellulaires pouvaient, contrairement à l'hypothèse précédemment proposée, être activés par une libération très faible de glutamate telle que celle observée en l'absence de potentiel d'action. Grâce à la caractérisation cinétique des événements portés par les récepteurs AMPA et kainate, nous avons pu quantifier la contribution de chacun à la transmission synaptique et nous avons pu montrer que la participation des récepteurs kainate était significative dans des conditions minimales d'activation du réseau. Nous concluons donc que la participation des récepteurs kainate à la transmission synaptique n'est pas subordonnée à l'expression d'une activité intense et/ou pathologique dans le système nerveux.

Dans une deuxième partie de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés au devenir de la participation des récepteurs kainate à la transmission synaptique dans un modèle animal d'épilepsie du lobe temporal. Les épilepsies du lobe temporal sont les plus fréquemment observées chez l'adulte et elles sont souvent pharmacorésistantes. La région cérébrale que nous avons étudiée présente des modifications importantes chez les patients atteints d'épilepsie du lobe temporal. Certains types cellulaires dégénèrent et la communication synaptique entre les neurones qui survivent est également fortement modifiée. Nous avons utilisé des modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal qui présentent des modifications très similaires à celles observées chez les patients atteints d'épilepsie du lobe temporal. Nous nous sommes intéressés à un type cellulaire en particulier au niveau duquel la stimulation des fibres glutamatergiques afférentes ne permettait pas d'activer des récepteurs kainate post-synaptiques chez le rat contrôle. Nos résultats montrent que la stimulation des fibres afférentes glutamatergiques active des récepteurs kainate post-synaptiques au niveau de

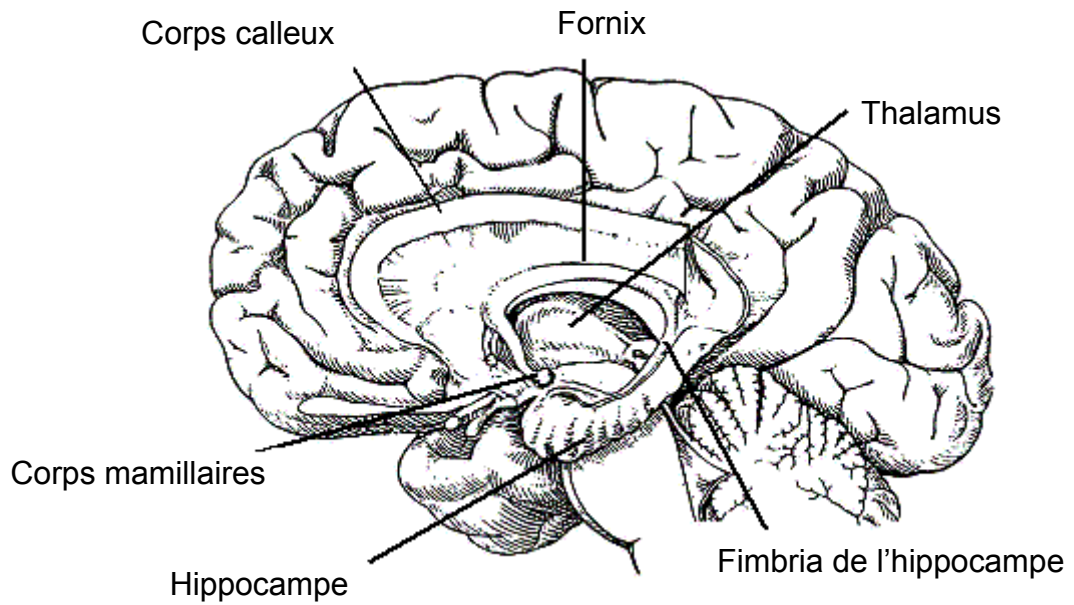
ce type cellulaire chez des animaux chroniquement épileptiques. Nous mettons ainsi en évidence pour la première fois une plasticité post-lésionnelle des récepteurs kainate post-synaptiques. Comme dans la première partie de notre travail nous avons pu montrer que les récepteurs kainate pouvaient être activés par de faibles quantités de glutamate libéré et que cette activation entraînait une dépolarisation post-synaptique plus faible et plus lente que celle induite par l'activation des récepteurs AMPA dans les mêmes cellules. Grâce à ces différences cinétiques nous avons pu quantifier la participation des récepteurs kainate post-synaptique à la transmission synaptique glutamatergique non-NMDA. Nous montrons que cette participation est très significative dans ce type cellulaire chez les rats chroniquement épileptiques tandis qu'elle est nulle chez les rats contrôles.

Ce mémoire comprend une première partie de rappels bibliographiques composée de quatre chapitres. Le premier chapitre concerne les différents types cellulaires présents dans la région cérébrale que nous avons étudié : la formation hippocampique. Le second chapitre concerne la transmission synaptique glutamatergique et les principaux types de récepteurs impliqués. Le troisième chapitre concerne les connaissances concernant les récepteurs kainate disponibles au moment où nous avons commencé ce travail de thèse. Enfin, le dernier chapitre s'intéresse à l'épilepsie du lobe temporel et aux modèles animaux permettant son étude. Dans une deuxième partie, les résultats obtenus au cours de ce travail sont présentés sous forme d'articles puis discutés.

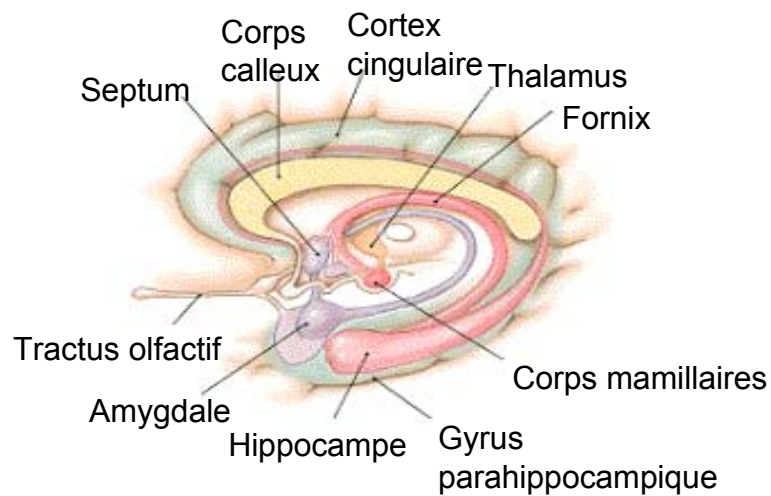
# Chapitre I :

## Anatomie de la formation hippocampique

A



B



**Figure 1. Anatomie de la formation hippocampique chez l'homme.**

A. Situation anatomique de l'hippocampe chez l'homme.

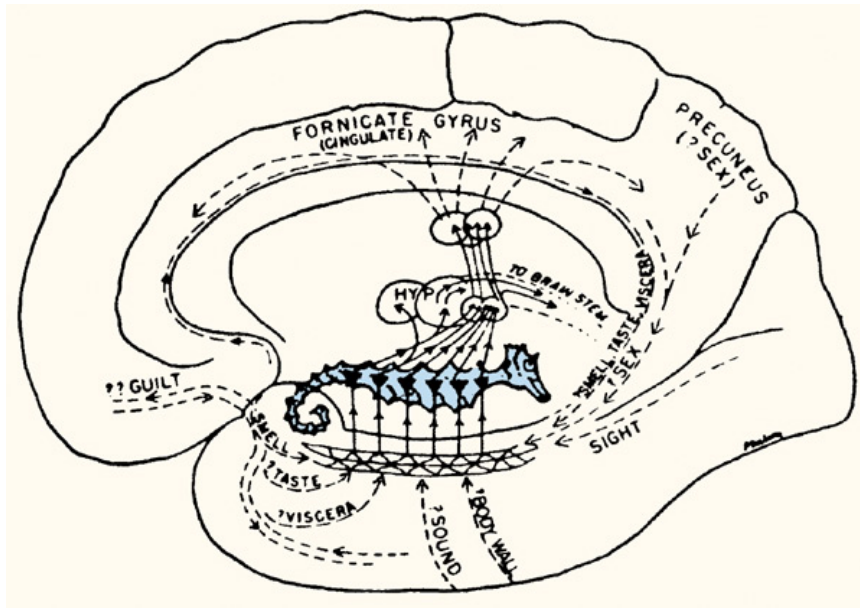
B. Les structures du circuit de Papez.

La formation hippocampique est une structure allongée, bilatérale et symétrique du système nerveux central, située chez l'homme dans la partie interne et médiane des lobes temporaux (Fig. 1A). La formation hippocampique a, dans un premier temps, été impliquée dans le traitement des informations émotionnelles au sein du circuit de Papez. En 1937, James Papez propose que les informations émotionnelles soient représentées au sein du lobe limbique, découvert par Paul Broca. Ce lobe comprend un certain nombre de structures primitives phylogénétiquement qui forment un cercle autour du tronc cérébral (Fig. 1B). On y trouve le cortex cingulaire, le cortex parahippocampique et la formation hippocampique. D'après Papez, l'hippocampe ferait le lien entre l'hypothalamus, siège des composantes périphériques des émotions et le néocortex, siège des aspects plus cognitifs. Ce circuit a ensuite été étendu par Mac Lean (Fig. 2A). En fait, si plusieurs structures du système limbique sont bien impliquées dans le traitement des informations émotionnelles comme le cortex cingulaire, le cortex para-hippocampique et principalement l'amygdale, de nombreuses autres structures telles que les corps mamillaires, le thalamus antérieur et la formation hippocampique ne participent pas directement à ce processus. Ces structures interviennent plutôt dans la mise en mémoire des informations.

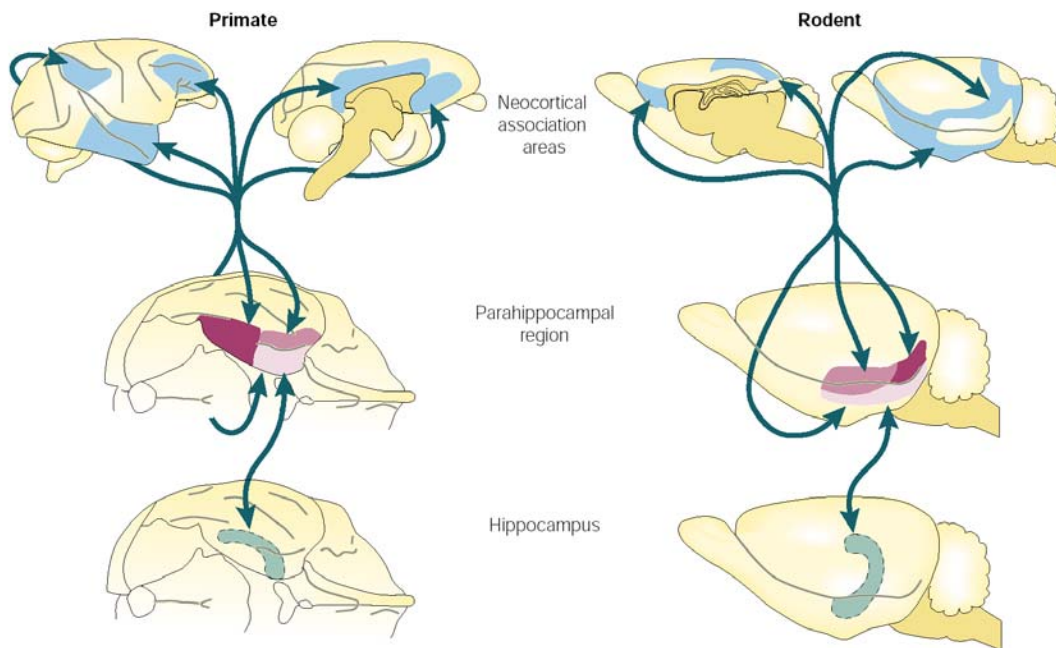
La mémoire nous permet de nous adapter à un environnement fluctuant. Les premiers travaux indiquant que les processus mnésiques pouvaient engager des régions précises du cerveau proviennent du neurochirurgien William Penfield, élève du célèbre neurophysiologiste Charles Sherrington. Penfield a utilisé des stimulations locales du cerveau de patients éveillés pendant des opérations destinées à supprimer la survenue de crises d'épilepsie. Au cours de ses travaux, il a observé que, dans certains cas, la stimulation des lobes temporaux provoquait l'émergence d'un souvenir chez les patients. D'autres données proviennent d'études réalisées dans les années 50 de patients épileptiques ayant subi, à des fins thérapeutiques, la résection de nombreuses structures du lobe temporal incluant l'hippocampe, l'amygdale et des structures associatives du cortex temporal. L'étude du patient H.M. a révélé qu'il avait des déficits mnésiques spécifiques, notamment une incapacité à mettre en mémoire à long terme de nouvelles informations. Les études de Brenda Milner ont permis de déterminer que ce déficit touchait principalement la mémoire spatiale et la mémoire dite épisodique, c'est à dire la mémoire explicite des événements de notre vie quotidienne. Des études plus récentes ont permis de déterminer que l'hippocampe et les structures qui lui sont associées (notamment le cortex peri-rhinal et parahippocampique) sont



A



B



**Figure 2: Rôle de la formation hippocampique.**

A. Circuit de traitement des émotions selon MacLean.

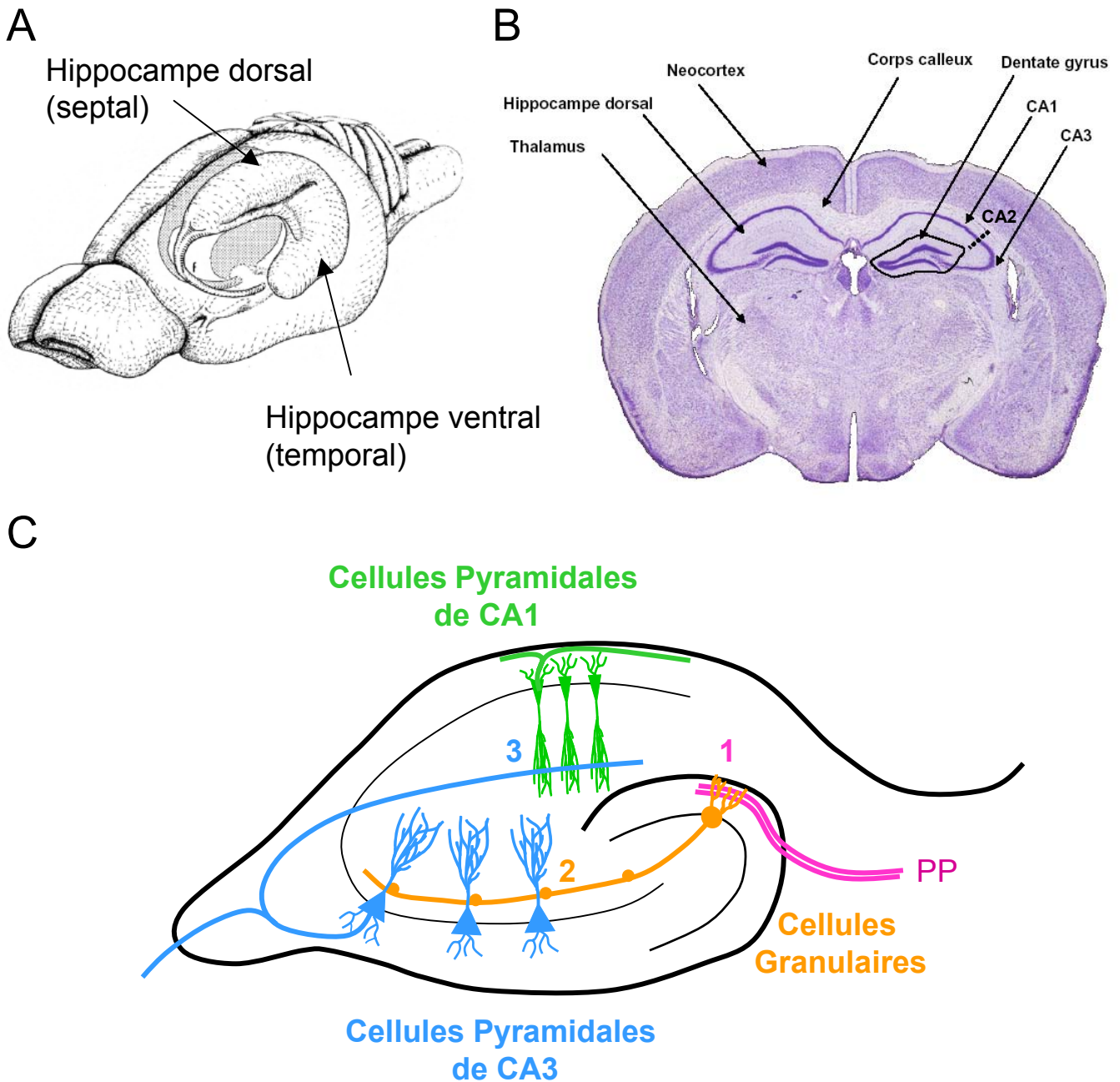
B. Rôle de l'hippocampe dans la mise en mémoire des informations.

Les informations en provenance des cortex associatifs (bleu) sont transmises via les cortex parahippocampiques (mauve) à l'hippocampe (vert). Après traitement, elles sont de nouveau transmises aux cortex associatifs pour y être stockées.

plus spécifiquement impliquées dans ce type de mémoire. Les événements stockés dans la mémoire épisodique sont, dans un premier temps, représentés au niveau de cortex associatifs polymodaux (les cortex pré-frontaux, limbiques et pariéto-temporaux occipitaux ; Fig. 2B) au niveau desquels sont regroupées les informations visuelles, auditives et somatiques relatives à l'événement. De là, l'information est transmise aux cortex parahippocampique et perirhinal, puis au cortex entorhinal et de là au gyrus denté et à l'hippocampe proprement dit. De l'hippocampe, l'information est de nouveau transmise via le subiculum au cortex entorhinal, puis aux cortex parahippocampique et perirhinal, enfin de nouveau aux aires associatives polymodales du néocortex. On parle ainsi de boucle de mise en mémoire cortico-hippocampique (Eichenbaum, 2000; Frankland and Bontempi, 2005).

### I.1. Principaux types cellulaires de la formation hippocampique

Chez le rat, animal modèle que nous avons choisi pour nos travaux, l'hippocampe est replié sur lui-même, et présente une partie dorsale en plus de la partie ventrale observée chez l'homme (Fig. 3A). On distingue grossièrement deux principaux types cellulaires dans la formation hippocampique : les *neurones* et les *cellules gliales*. (i) Les cellules gliales ne sont pas principalement impliquées dans le traitement des informations. On en distingue quatre types: les *astrocytes*, les *oligodendrocytes*, les cellules de la *microglie* et les *fibroblastes*. Les astrocytes représentent environ 75% des cellules non-neuronales (Beach et al., 1982), ils ont de fins prolongements qui viennent entourer les vaisseaux sanguins formant ainsi la barrière hémato-encéphalique. Leurs prolongements entourent aussi les synapses. A ce niveau les astrocytes sont impliqués dans la synthèse et la recapture des neurotransmetteurs (voir Chapitre II). Les oligodendrocytes ont également de fins prolongements qui viennent myéliniser les gros axones. Les cellules de la microglie sont impliquées dans la phagocytose des déchets cellulaires. Les fibroblastes servent principalement de cellules de soutien. (ii) Les neurones de l'hippocampe se répartissent en deux populations : les *cellules principales* (cellules pyramidales et cellules granulaires) qui sont excitatrices et qui représentent 90% des neurones de la formation hippocampique et les *interneurones* qui sont inhibiteurs et représentent 10% des neurones de la formation hippocampique. Un troisième type de cellules, les cellules de *Cajal-Retzius* sont présentes transitoirement au cours du développement et participeraient à la migration des neurones ainsi qu'à la formation correcte des premières synapses (pour revue voir Frotscher, 1998).



**Figure 3. Anatomie de l'hippocampe de rat.**

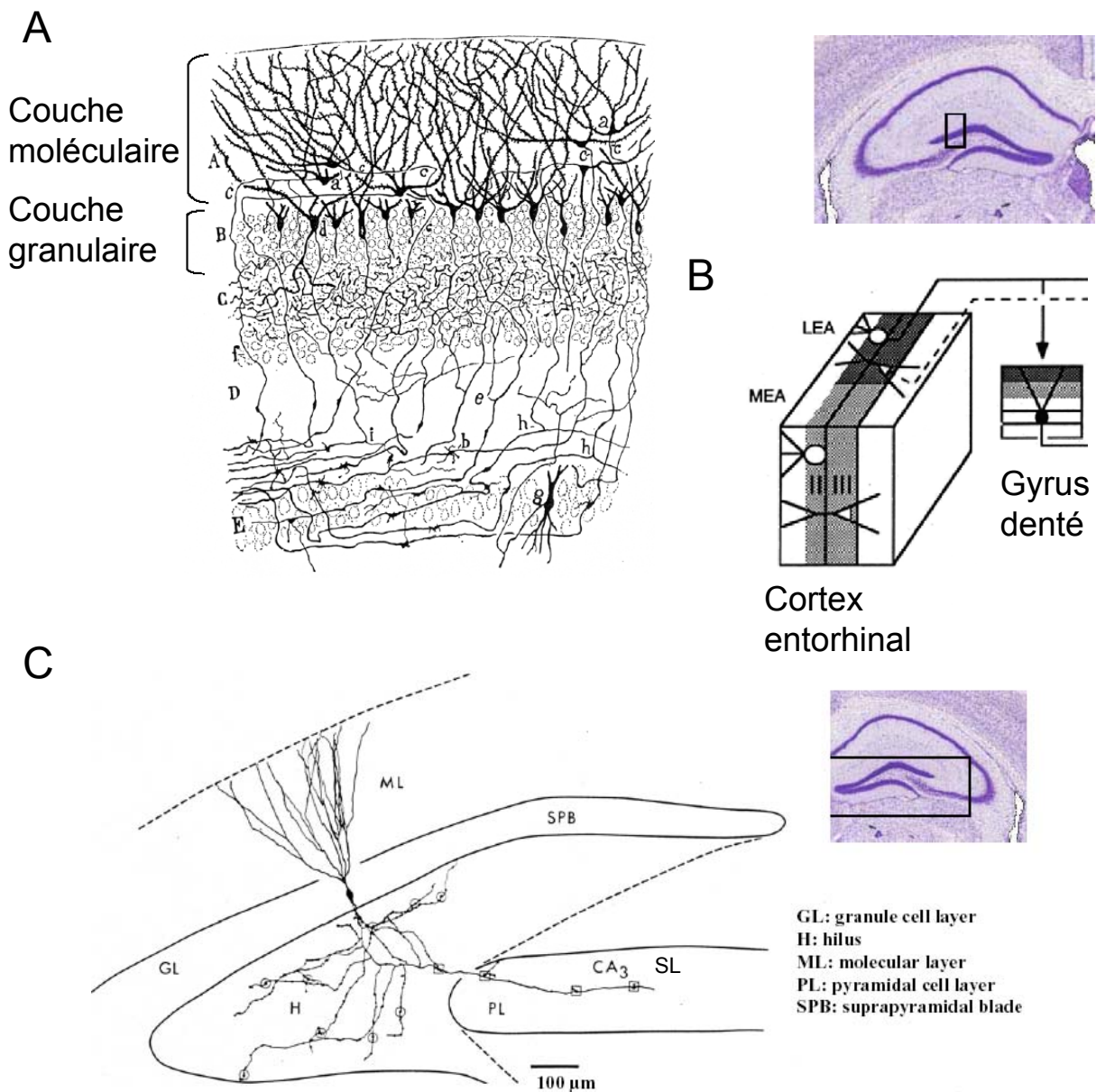
- A. Situation de l'hippocampe dans le système nerveux de rat
- B. Marquage au crésyl violet montrant la répartition des cellules principales de l'hippocampe sur une tranche coronale.
- C. Les cellules principales de l'hippocampe et le circuit tri-synaptique hippocampique.

## I.2. Organisation cytologique des cellules principales de la formation hippocampique

La description morphologique des principaux types de cellules principales dans la formation hippocampique ainsi que leur connectivité repose en grande partie sur les travaux de Camillo Golgi (Golgi et al., 2001) Ramon y Cajal (1911) et de Lorente de No (1934). Sur une coupe coronale, on peut macroscopiquement observer que les cellules principales se répartissent en deux fines couches repliées l'une sur l'autre. L'une de ces couches, où se répartissent les cellules granulaires, est nommée le gyrus denté (*Fascia Dentata* en rapport à son aspect dentelé), l'autre est la corne d'Ammon (l'hippocampe proprement dit) formée par les cellules pyramidales (Fig. 3B). La corne d'Ammon a elle-même été subdivisée en différentes régions: Les régions CA1, CA2 et CA3 (Lorente de No, 1934 ; Fig. 3B). Nos travaux concernent principalement trois régions de la formation hippocampique : les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe et le gyrus denté. Nous verrons que les cellules principales de ces régions sont fonctionnellement différentes, notamment concernant la transmission synaptique due à l'activation des récepteurs kainate (voir Chapitre III). La région CA3 a elle-même été subdivisée en 3 sous régions : les régions CA3a, CA3b et CA3c (selon Lorente de No, 1934), la région CA3c étant la plus proche du gyrus denté sur une coupe transversale d'hippocampe. La région CA2, peu différenciée chez le rat, n'a pas été spécifiquement étudiée dans ce travail. Fonctionnellement, les cellules principales de l'hippocampe s'organisent en un circuit tri-synaptique excitateur : les cellules granulaires du gyrus denté reçoivent les informations en provenance du cortex entorhinal par la voie perforante, elles projettent sur les cellules pyramidales de la région CA3 par la voie des fibres moussues, enfin les cellules pyramidales de CA3 projettent sur les cellules pyramidales de la région CA1 par les collatérales de Schaffer (Fig. 3C).

### I.2.1. Le gyrus denté

Le gyrus denté est considéré comme le premier maillon du circuit tri-synaptique de la formation hippocampique et la « porte d'entrée » des informations en provenance du cortex entorhinal dans l'hippocampe. Les cellules principales du gyrus denté sont les cellules granulaires, au nombre d'environ 1 million chez le rat et 5 millions chez le singe (Claiborne et al., 1990; Seress, 1988 ; Fig. 4) et les cellules moussues qui se trouvent dans le *hilus* (Amaral, 1978). Le *hilus*, où zone polymorphe, est située sous la couche des cellules



**Figure 4. Les cellules granulaires.**

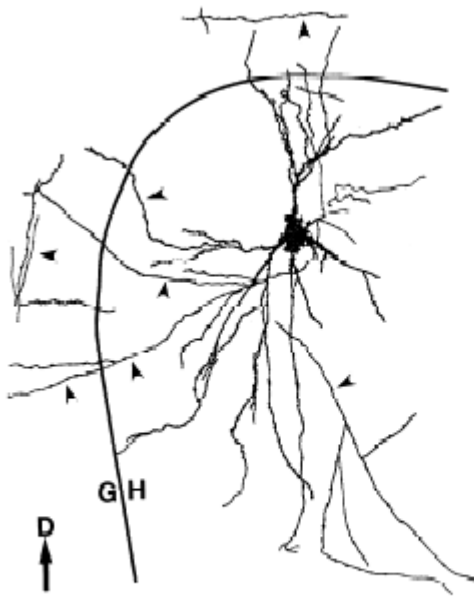
- A. Les cellules granulaires du gyrus denté.
- B. Afférences des cellules granulaire en provenance du cortex entorhinal.  
MEA: cortex entorhinal médian, LEA: cortex entorhinal latéral
- C. Organisation de l'axone des cellules granulaires: les fibres moussues.  
Elles arborisent dans les hilus (H) et traversent le stratum lucidum (SL) de la région CA3.

D'après Ramon y Cajal., 1911 (A); Claiborne et al., 1986 (B)

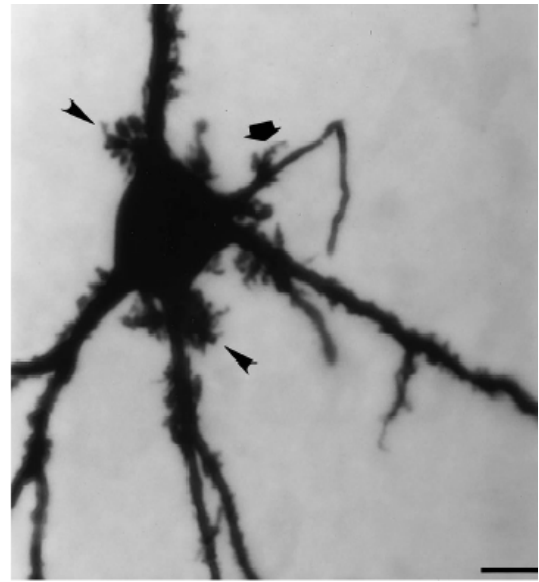
granulaires entre cette dernière et les dendrites des cellules pyramidales de la région CA3c qui s'insèrent entre la partie supérieure (suprapyramidale) et la partie inférieure (infrapyramidale) du gyrus denté. Les cellules granulaires ont un petit diamètre (environ 8-12  $\mu\text{m}$ ) et forment une couche relativement dense de corps cellulaires, appelée la couche des cellules granulaires (*stratum granulosum*). Les cellules granulaires ont caractéristiquement 2 dendrites apicaux primaires qui partent généralement directement du corps cellulaire et atteignent la surface de la pie-mère au niveau de la fissure hippocampique (Fig. 4A). À l'exception de sa partie la plus proximale, l'arbre dendritique des cellules granulaires est couvert d'épines. L'ensemble de l'arbre dendritique des cellules granulaires est confiné dans la couche moléculaire (*stratum moleculare*), adjacente à la couche des cellules granulaires (Fig. 4A). Chez le rat adulte, les cellules granulaires ont rarement des dendrites basilaires, mais celles qui en ont sont généralement situées dans la partie ventrale de la formation hippocampique. La proportion de cellules granulaires ayant des dendrites basilaires serait plus importante chez les primates dont l'homme (25-30 %; Frotscher et al., 1988; Seress and Mrzljak, 1987; Lim et al., 1997). Les cellules granulaires sont la cible principale des cellules en étoile de la couche II du cortex entorhinal qui les contactent via la voie perforante. Celles situées au niveau du cortex entorhinal médian projettent au niveau du tiers médian de la couche moléculaire tandis que celles situées au niveau du cortex entorhinal latéral projettent au niveau du tiers externe de la couche moléculaire (Fig. 4B). Les axones des cellules granulaires, appelés *fibres moussues* (par homologie aux fibres moussues décrites par Ramon y Cajal dans le cervelet) traversent le *hilus* où ils se divisent en de nombreuses collatérales (Fig. 4C ; Claiborne et al., 1986). Ces collatérales contactent souvent le corps cellulaire et les dendrites proximaux des cellules en panier, inhibitrices, qui se trouvent à la bordure entre la couche des cellules granulaires et le *hilus* (Ribak and Peterson, 1991). L'axone principal des cellules granulaires quitte le *hilus* et poursuit son trajet dans la région CA3 où il contacte les cellules pyramidales par l'intermédiaire de boutons « en passant » géants nommés *terminaisons moussues*. Cette projection a une organisation lamellaire, elle présente peu de divergence selon l'axe septo-temporal et est bien conservée dans les tranches transversales d'hippocampe. Les cellules excitatrices du *hilus* sont les cellules moussues (Fig. 5A). Leurs dendrites et leur soma, confinés dans le *hilus*, sont couverts de grosses épines caractéristiques, appelées excroissances épineuses (*thorny excrescences*, Fig. 5B), au niveau desquelles viennent faire synapse les terminaisons moussues géantes (Amaral, 1978). L'axone principal des cellules moussues, myélinisé, se dirige vers la fimbria. Des collatérales non-myélinisées traversent la couche des cellules granulaires et arborescent dans le tiers interne de la couche moléculaire du gyrus denté



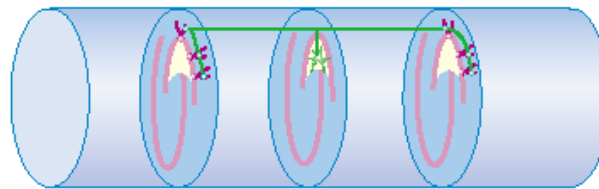
A





B

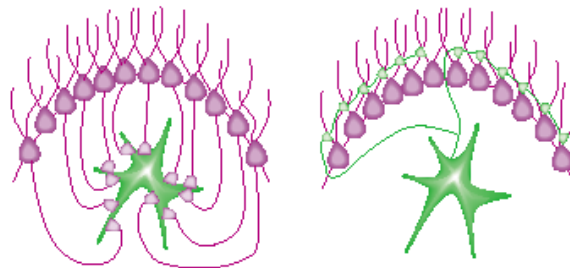


C



 Mossy cell  
 Granule cell

CA1  
 CA3 H DG



## Figure 5. Les cellules moussues

- A. Position des dendrites et de l'axone d'une cellule moussue.  
 B. Les excroissances épineuses (petites flèches).  
 C. Convergence des afférences et divergence de efférences au niveau des cellules moussues.

D'après Scharfman H., 2001 (A,B); Ratzliff et al., 2002 (C)

des hippocampes ipsi- et contra-latéraux (Fig. 5A). A ce niveau, elles forment la majorité de leurs synapses (>90%) sur les épines dendritiques des cellules granulaires (Amaral, 1978; Laurberg and Sorensen, 1981; Ribak et al., 1985; Buckmaster et al., 1996). Ces synapses asymétriques sont excitatrices (Soriano and Frotscher, 1994; Scharfman, 1995). Cette projection diverge fortement selon l'axe temporo-septal de l'hippocampe (de 2 à 4 mm (Buckmaster et al., 1996 ; Fig. 5C) ce qui suggère que les cellules moussues intègrent les informations d'un ensemble local de cellules granulaires pour les redistribuer à des cellules granulaires plus distantes. Les axones des cellules moussues émettent aussi des collatérales moins nombreuses qui restent dans le *hilus* où elles contactent vraisemblablement des interneurones.

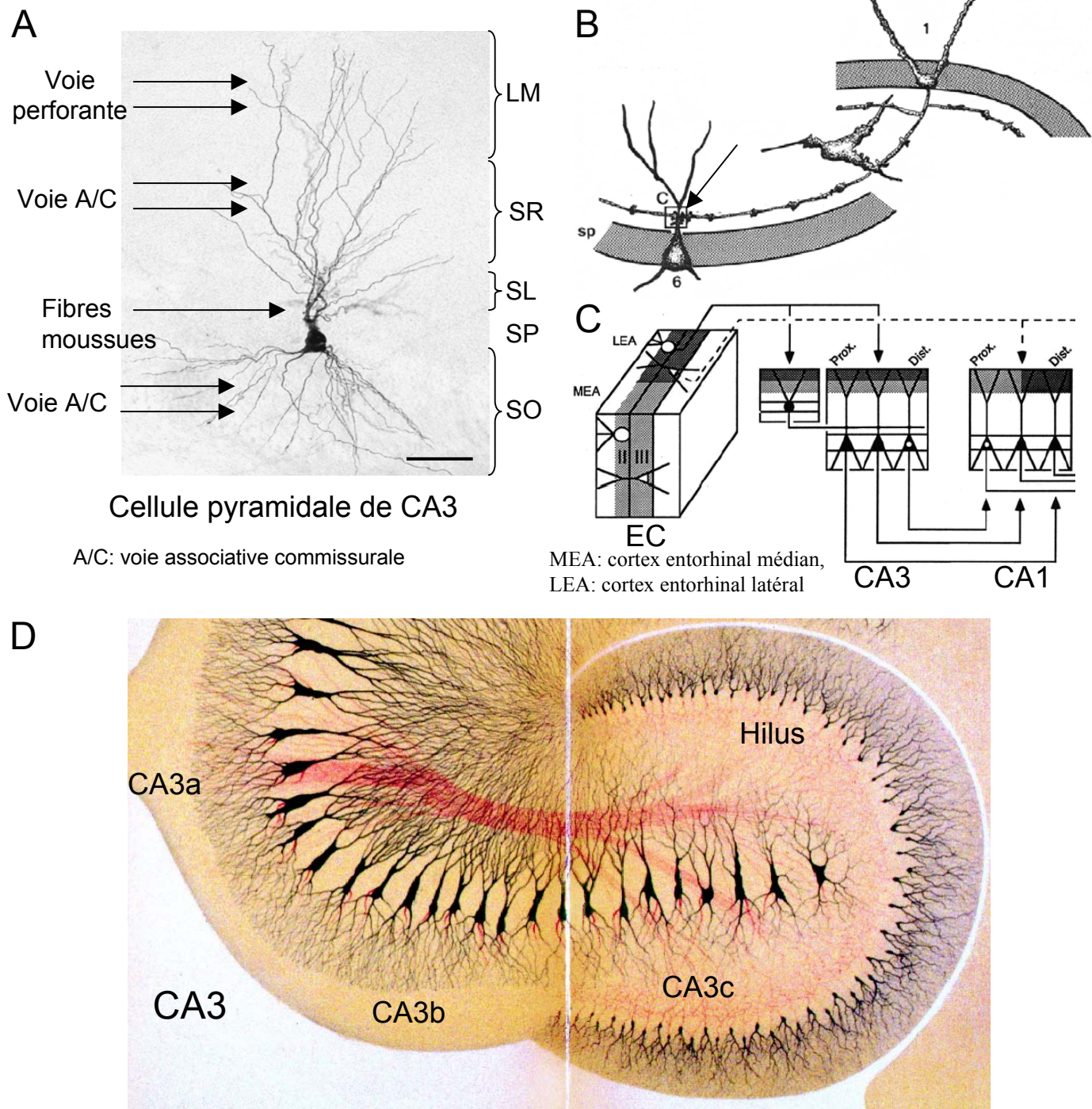
### I.2.2. La corne d'Ammon

Les cellules pyramidales de la corne d'Ammon ont une organisation laminaire très précise : les corps cellulaires de ces cellules forment le *stratum pyramidale*, leurs dendrites basales définissent le *stratum oriens*, la partie la plus proximale de leur dendrite apicale forme le *stratum lucidum* (uniquement dans la région CA3) puis le *stratum radiatum* enfin la partie la plus distale des dendrites apicales forme le *stratum moleculare*.

#### I.2.2.1 La région CA3

La région CA3 constitue le second maillon du circuit tri-synaptique hippocampique (Fig. 3C). Les cellules pyramidales de cette région sont la cible principale des fibres moussues issues des cellules granulaires du gyrus denté. Selon Lorente de No (1934) on peut subdiviser cette région en trois sous régions : la région CA3c qui pénètre le *hilus*, la région CA3a qui est la portion courbe contiguë avec la région CA2 et la région CA3b qui se trouve entre les deux autres régions (Fig. 6D). Nous verrons que les cellules de ces régions diffèrent en terme de morphologie mais aussi de projection axonale. Les cellules pyramidales de CA3 sont caractérisées par un corps cellulaire large duquel partent un ou deux gros dendrites apicaux primaires, orientés radialement, qui se ramifient rapidement dans le *stratum radiatum* et le lacunosum moleculare (Fig. 6A). A ce niveau ils donnent naissance à des dendrites de plus en plus fins jusqu'à atteindre la fissure hippocampique pour les cellules des régions CA3a et CA3b ou la limite du *hilus* pour les cellules de la région CA3c (Ramon y Cajal, 1910 ; Fig. 6D). Les dendrites basales sont plus nombreux que les dendrites apicaux et





**Figure 6. La région CA3 de l'hippocampe**

A. Organisation laminaire des afférences des cellules pyramidales de CA3.

B. Voie des fibres moussues dans CA3. Noter les boutons moussus (flèche).

C. Organisation des projections du cortex entorhinal (EC) vers la formation hippocampique.

D. Différences morphologiques entre les cellules pyramidales de CA3a,b et c.

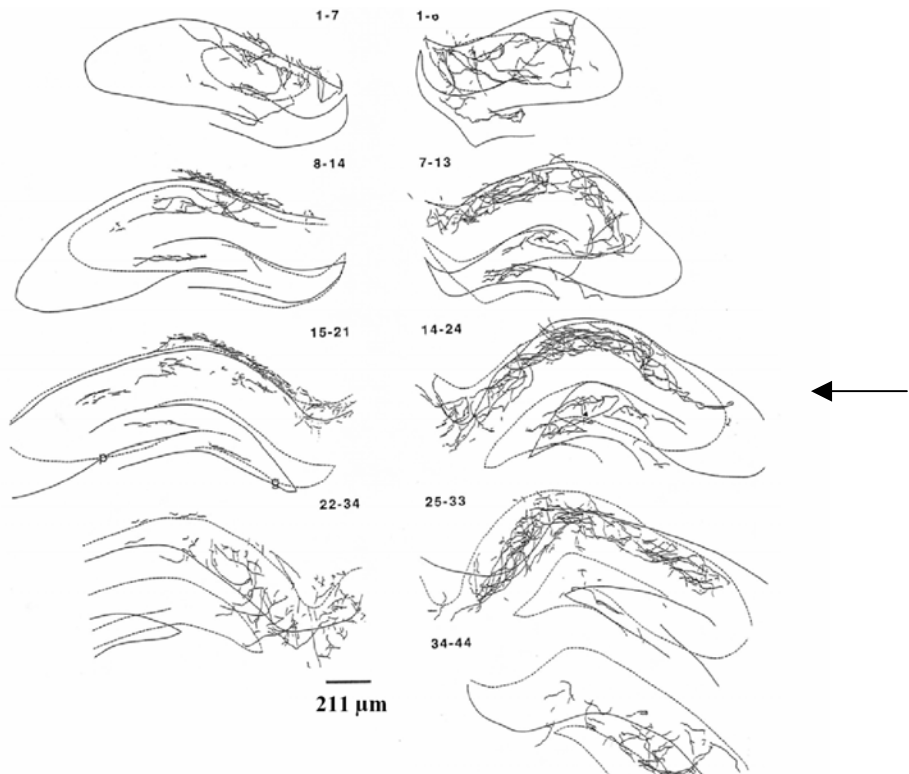
SO: Stratum Oriens, SP: Stratum Pyramidale, SL: Stratum Lucidum, SR: Stratum Radiatum, LM: Stratum Lacunosum Moleculare

D'après Frotscher et al., 1994 (B); Golgi., 2001 (D)

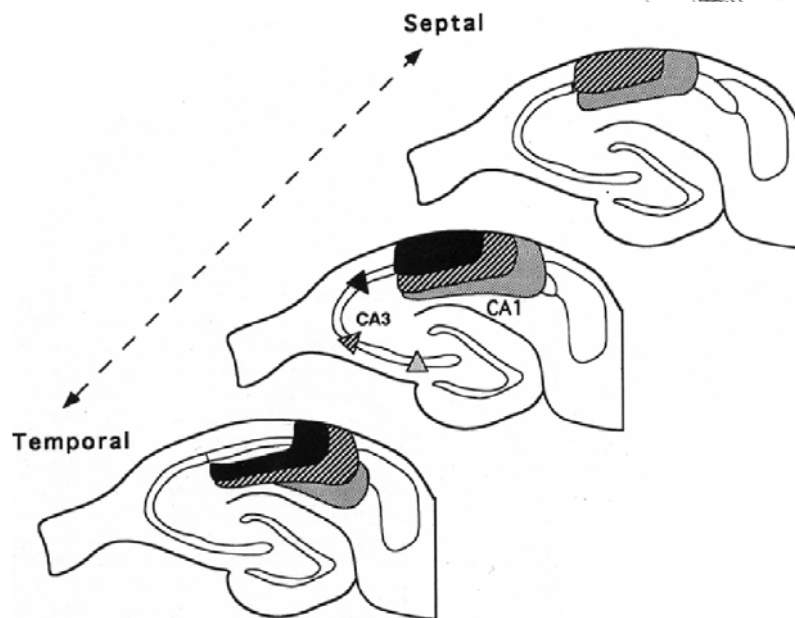
arborisent dans le *stratum oriens* en direction de l'alveus. Les larges dendrites apicaux primaires des cellules pyramidales de CA3 présentent les mêmes excroissances épineuses que celles observées au niveau des cellules moussues du *hilus* (Ramon y Cajal, 1910 ; Lorente de No 1934 ; Blackstad and Kjaerheim, 1961). Ces excroissances s'associent avec les larges boutons moussus en passant dans le *stratum lucidum* pour former le complexe synaptique moussu (Fig. 6B; Soriano and Frotscher, 1994). L'arbre dendritique des cellules pyramidales de la région CA3c est plus symétrique que celui des cellules pyramidales des régions CA3a et CA3b (Fig. 6D). Les dendrites basilaires et apicaux ont la même taille, sont relativement courts et sont tous les deux couverts par de nombreuses excroissances épineuses. Ces dernières sont en revanche rares au niveau des dendrites basilaires des cellules pyramidales des régions CA3a et CA3b. Comme au niveau du gyrus denté, les afférences excitatrices ont une organisation laminaire précise au niveau de la région CA3. En plus des afférences moussues au niveau du *stratum lucidum*, les cellules pyramidales de CA3 sont contactées au niveau des *strata radiatum* et *oriens* par des afférences dites associatives et commissurales en provenance des autres cellules pyramidales de CA3 des hippocampes respectivement ipsi- et contra-latéraux (Fig. 6A). Les cellules pyramidales de CA3 reçoivent enfin au niveau du *stratum lacunosum moleculare* des afférences directes en provenance des cellules étoilées de la couche II du cortex entorhinal. Comme au niveau du gyrus denté, les cellules du cortex entorhinal latéral projettent plus distalement que les cellules du cortex entorhinal médian (Lopes da Silva et al., 1990; Fig. 6C).

L'axone des cellules pyramidales de CA3 part soit directement du corps cellulaire au niveau du pôle basale soit d'un épais dendrite apical primaire (Ramon y Cajal, 1911). Il descend ensuite plus ou moins obliquement pour rejoindre l'alveus. Auparavant, dans le *stratum oriens*, il émet des collatérales qui arborisent au niveau des *strata oriens* et *radiatum* de la région CA3 et se projettent également au niveau des *strata oriens* et *radiatum* de la région CA1 (Schaffer, 1892). Globalement l'arborisation axonale des cellules pyramidales de la région CA3 est très importante et très divergente. Une cellule pyramidale de CA3 fait rarement plus d'une synapse au niveau d'une cellule cible et l'on estime qu'une seule de ces cellules pourrait ainsi contacter entre 30 000 et 60 000 cellules cibles dans l'hippocampe (Li et al., 1994; Sik et al., 1993). Le marquage de cellules pyramidales de CA3 *in vivo* montre que l'axone de ces cellules diverge fortement selon l'axe temporo-septal de l'hippocampe (Fig. 7A; Li et al., 1994). En fait la densité axonale dans le plan transversal contenant le corps cellulaire est assez faible et augmente progressivement lorsque l'on considère des coupes plus septales ou plus temporales. Globalement la divergence ainsi que la longueur axonale est plus

A



B



**Figure 7. Organisation spatiale de la projection des cellules pyramidales de CA3 vers CA1**

A. Exemple de l'étendue spatiale de la projection d'une cellule pyramidale de CA3c (flèche) injectée in vivo vers CA1.

B. Schéma de l'organisation septo-temporale de la projection des cellules pyramidales de CA3 vers CA1.

importante dans la région CA1 que dans la région CA3. Au-delà de ces caractéristiques générales, la projection axonale des cellules pyramidales de CA3 est différente selon que ces cellules appartiennent aux régions CA3a, CA3b et CA3c. Pour plus de clarté, nous allons décrire cette projection pour les cas extrêmes des cellules des régions CA3a et CA3c (voir Fig. 7B) en gardant à l'esprit qu'entre elles, il existe un continuum de type de projection. Les projections de ces cellules diffèrent principalement selon :

- La zone de projection CA3 versus CA1: Les cellules pyramidales de la région CA3a projettent plus massivement sur les autres cellules pyramidales de CA3 et moins sur les cellules pyramidales de CA1. Inversement les cellules pyramidales de CA3c projettent plus massivement sur les cellules pyramidales de CA1 et moins sur les autres cellules pyramidales de CA3. Donc sur une tranche transversale d'hippocampe, la majorité des récurrentes de CA3 seraient présentes dans la portion CA3a.
- La zone de projection au sein de la région CA3 : les cellules pyramidales de CA3a projettent principalement sur les autres cellules pyramidales de CA3a et il en est de même pour les cellules pyramidales de CA3c.
- La zone de projection dans la région CA1: Les cellules pyramidales de CA3a projettent principalement sur les cellules de CA1 qui se trouvent à proximité, c'est à dire proches de la région CA2. Inversement les cellules pyramidales de la région CA3c projettent principalement sur les cellules pyramidales de CA1 qui sont les plus éloignées, c'est à dire plus proches du *subiculum* (Fig. 6C).
- La zone dendritique contactée au niveau des pyramidales de CA1: Les cellules pyramidales de CA3a projettent principalement sur les dendrites basales des cellules pyramidales de CA1 au niveau du *stratum oriens* et sur les dendrites apicales dans la partie proximale du *stratum radiatum*. Les cellules pyramidales de CA3c projettent préférentiellement dans la partie la plus distale du *stratum radiatum*.

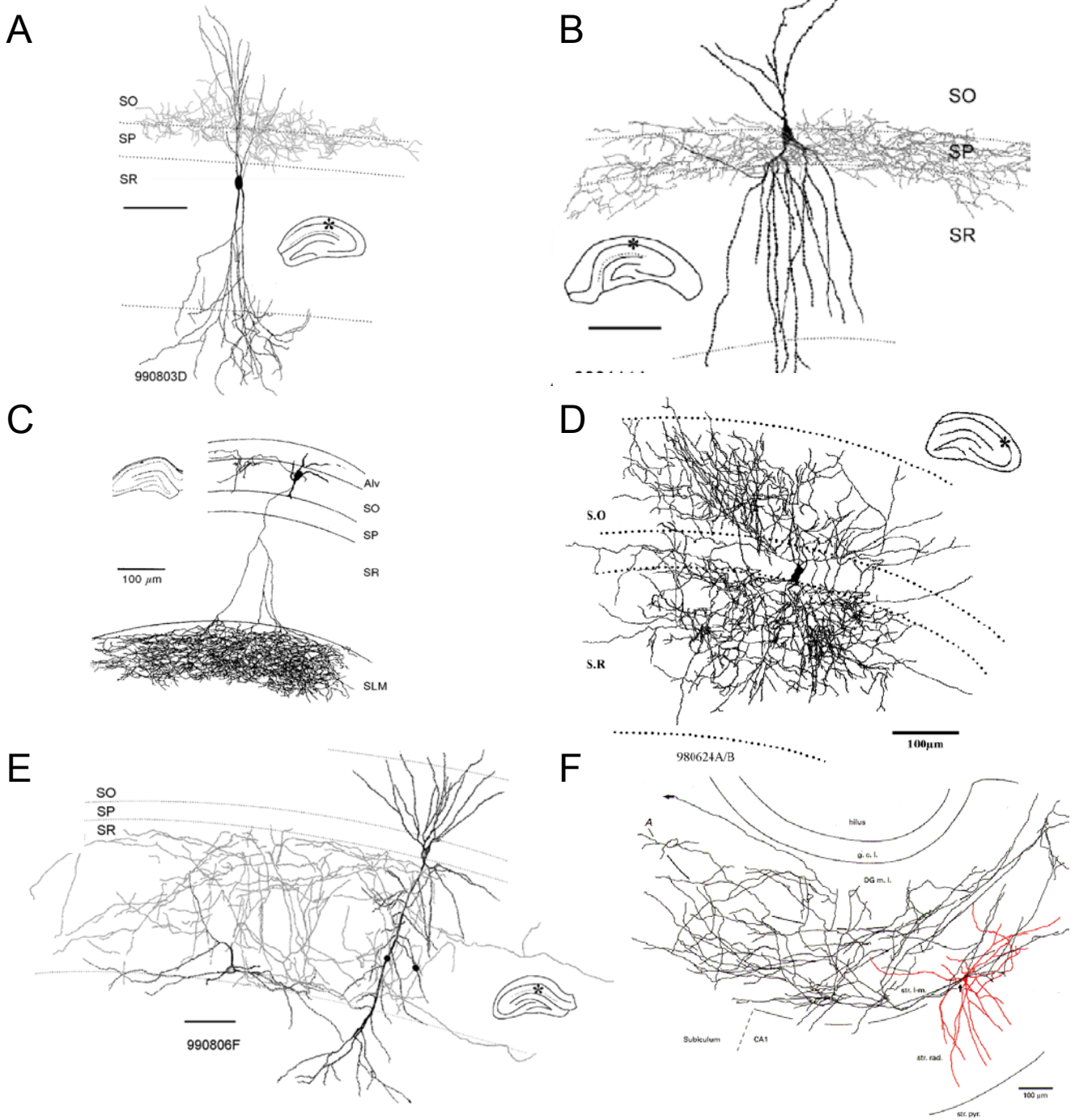
Du fait de ces différences, on peut imaginer que lorsqu'un ensemble de cellules pyramidales de CA3 est activé par un ensemble de cellules granulaires au sein de la même lame transversale d'hippocampe, les cellules pyramidales de CA1 activées par la suite, seront à la fois plus étendues spatialement selon l'axe temporo-septal et moins nombreuses (cellules

activées à la fois au niveau des dendrites basilaires et apicaux) d'où une dispersion spatiale de l'information (Li et al., 1994).

Les cellules pyramidales de CA3c projettent également au niveau du *hilus* où elles contacteraient les cellules moussues (Scharfman, 1994). Certaines cellules pyramidales de CA3c de l'hippocampe ventral chez le rat pourraient également projeter au niveau de la couche moléculaire interne du gyrus denté où elles pourraient contacter les cellules granulaires (Li et al., 1994). Enfin, les cellules pyramidales de CA3 projettent au niveau de l'hippocampe contralatéral (voie commissurale) et au niveau du noyau septal latéral (Swanson et al., 1980; Tamamaki et al., 1984).

#### I.2.2.2. La région CA1

La région CA1 représente le dernier maillon du circuit tri-synaptique hippocampique et est une des cibles principales des axones des cellules pyramidales de CA3, les collatérales de Schaffer. Les cellules pyramidales de cette région ont des corps cellulaires plus fins que les cellules pyramidales de la région CA3. Ces cellules émettent un dendrite unique, orienté radialement, qui se divise dans le *stratum radiatum*. Ces dendrites se terminent en général par une touffe de fines branches dans le *stratum lacunosum moleculare* et atteignent souvent la fissure hippocampique. Les dendrites basilaires abondent dans le *stratum oriens* en atteignant souvent l'alveus. L'arbre dendritique est couvert d'épines mais ne présente pas les excroissances épineuses observées sur les cellules pyramidales de CA3 et les cellules moussues du *hilus*. A leur place, on observe de petits dendrites fins plus ou moins transversaux. L'axone émerge de la partie apicale du corps cellulaire ou de temps en temps du dendrite basale, et se dirige vers l'alveus. Les axones des pyramidales de CA1 arborescent assez peu localement chez l'adulte (Aniksztejn et al., 2001) et les collatérales restent confinées dans le *stratum oriens* de CA1 (Ramón y Cajal, 1910; Lorente de Nó 1934 ; Tamamaki and Nojyo, 1990). Les cellules principales de la région CA1 projettent principalement au niveau du subiculum et du cortex entorhinal, mais également vers d'autres structures corticales du système limbique ainsi que le septum latéral, le noyau accumbens et le bulbe olfactif. La région CA1 avec le subiculum peut donc être considérée comme la voie de sortie principale de l'hippocampe vers le cortex entorhinal et indirectement vers la plupart des aires corticales associatives. En plus des collatérales de Schaffer, les cellules pyramidales de CA1 sont contactées par les cellules pyramidales de la couche III du cortex entorhinal. Celles



SO: Stratum Oriens, SP: Stratum Pyramidale, SL: Stratum Lucidum, SR: Stratum Radiatum, SLM: Stratum Lacunosum Moleculare

## Figure 8. Exemples d'interneurones dans la région CA1

- A. Cellule en chandelier
- B. Cellule en panier (PV+)
- C. Cellule de type O-LM
- D. Interneurone bi-stratifié
- E. Interneurone associé aux collatérales de Schaffer
- F. Interneurone associé à la voie perforante.

D'après Ali et al., 1998 (C); Pawelzik et al., 2002 (A, B, E); Thomson et al., 2000 (D); Vida et al., 1998 (F)



situées dans la partie médiane du cortex entorhinal contactent les cellules pyramidales de CA1 les plus proximales (plus proches de la région CA2) et celles situées dans la partie latérale contactent les cellules pyramidales de CA1 situées dans la partie distales (plus proche du subiculum; Fig. 6C).

Un autre type de cellules principales a récemment été décrit dans la région CA1 au niveau du *stratum radiatum*. Ces cellules ont deux dendrites apicaux primaires qui traversent toutes les couches et un axone qui envoie plusieurs collatérales au niveau du *stratum oriens* de la région CA1 avant de se diriger vers la fimbria où il devient myélinisé. Ces cellules sont vraisemblablement excitatrices car elles forment des synapses asymétriques au niveau du *stratum oriens* (Gulyas et al., 1998).

### I.3. Les interneurones de la formation hippocampique

Les interneurones ont, dans un premier temps, été définis comme des cellules dont l'axone ne quittait pas la formation hippocampique. Aujourd'hui, le terme d'interneurone s'applique aux cellules non principales de l'hippocampe qui utilisent le GABA comme neurotransmetteur (Freund and Buzsaki, 1996). Contrairement aux cellules principales qui forment une population plutôt homogène, les interneurones inhibiteurs sont beaucoup plus hétérogènes en terme de localisation de leur corps cellulaire, de leur zone de projection axonale, de la morphologie de leurs dendrites et de leur contenu neurochimique (Fig. 8). On distingue notamment les interneurones selon l'expression de protéines chélatrices du calcium comme la parvalbumine (PV), la calrétinine (CR) ou la calbindine (CB) et de neuropeptides comme la cholécystoquinine (CCK), la somatostatine (SM) ou le peptide vasoactif intestinal (VIP) (Somogyi and Klausberger, 2005; Freund and Buzsaki, 1996). Le profil d'expression de ces protéines ainsi que la spécificité de leurs zones d'arborisations dendritiques et de projection axonales permet de définir différentes « classes » d'interneurones (Freund and Buzsaki, 1996; Somogyi and Klausberger, 2005 mais voir Parra et al., 1998).

#### I.3.1 Les cellules en chandelier ou axo-axoniques

Ces cellules doivent leur nom de *cellules en chandelier* à la forme particulière de leur collatérales axonales qui montent régulièrement dans le *stratum pyramidale* parallèlement aux segments initiaux des axones des cellules principales (Szentagothai and Arbib, 1974; Fig. 8A). Le nom plus fonctionnel de *cellule axo-axonique* provient du fait qu'elles contactent

exclusivement le segment initial de l'axone des cellules principales (Somogyi, 1977). Ces cellules ont un corps cellulaire de forme pyramidale situé principalement dans ou immédiatement adjacent à la couche des cellules principales ainsi qu'un arbre dendritique lisse (sans épines) transversal qui traverse toutes les couches de la formation hippocampique (Li et al., 1992; Gulyas et al., 1993a; Buhl et al., 1994b; Pawelzik et al., 2002; Fig. 8A). Le nombre de terminaisons axonales correspond au nombre de cellules principales innervées. Ce nombre a été estimé à 1200 pour une cellule axo-axonique reconstruite in vivo dans la région CA1 (Li et al., 1992). Le nombre de synapses inhibitrices au niveau du segment initial de l'axone, estimé en microscopie électronique, permet d'établir une convergence d'environ 4 à 10 cellules axo-axoniques sur une cellule principale (Li et al., 1992). Dans la région CA1 de l'hippocampe, les synapses formées par ces cellules contiennent des récepteurs GABA<sub>A</sub> enrichis en sous-unité  $\alpha 2$  (Nusser et al., 1996). Certaines cellules axo-axoniques ont un corps cellulaire dans le *stratum oriens* et des dendrites horizontaux restreints à cette zone (Ganter et al., 2004).

### I.3.2 Les cellules en panier

Ces cellules contactent le corps cellulaire et les dendrites proximaux des cellules principales. Elles contactent également d'autres cellules en panier (formant parfois des autapses) et d'autres interneurons non identifiés. Les cellules en panier contenant une protéine chélatrice du calcium, la parvalbumine (PV+), sont de plus couplées entre elles électriquement (Venance et al., 2000; Hormuzdi et al., 2001). Leur corps cellulaire, généralement de forme pyramidale, peut se trouver dans toutes les couches de la formation hippocampique (Ramon y Cajal, 1911; Lorente de No, 1934). Leurs dendrites sont généralement orientés radialement et traversent toutes les couches de l'hippocampe (Fig. 8B). Ces cellules pourraient ainsi recevoir des messages en provenance des principales afférences excitatrices : les fibres moussues dans la région CA3, les collatérales de Schaffer dans la région CA1, les afférences commissurales et associatives dans les *strata oriens* et *radiatum* de CA3 et dans le *stratum oriens* de CA1 ainsi que les afférences entorhinales. Certaines cellules en panier ayant leur corps cellulaire dans l'oriens de CA1 et des dendrites horizontaux dans cette couche ont également été décrites. L'étendue de l'axone des cellules en panier est de 900 à 1300  $\mu\text{m}$  dans une tranche de 450  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. L'axone est le plus dense proche du corps cellulaire puis se raréfie en s'en écartant. Des reconstructions de cellules en panier in vivo rapportent entre 9000 et 12000 boutons synaptiques. Etant donné qu'une cellule en



panier établi entre 2 et 10 contacts synaptiques, elle pourrait innervier entre 1500 à 2500 cellules principales. Inversement, les cellules principales ne forment qu'un seul contact synaptique au niveau des cellules en panier. Ainsi les 2000 synapses asymétriques sur les dendrites des cellules en panier proviendraient de 2000 cellules principales différentes. En fonction de leur contenu en parvalbumine (PV), une protéine chélatant le calcium et en cholecystoquinine (CCK), un neuropeptide, on distingue deux sous classes de cellules en panier : les cellules en panier contenant la parvalbumine et pas la cholecystokinine (PV+, CCK-) et les cellules en panier (PV-, CCK+). On estime qu'au niveau du corps cellulaire d'une cellule pyramidale de CA1, 68% des synapses inhibitrices formées sont PV+ et 32% PV- (Nyiri et al., 2001). Nous verrons que ces deux types cellulaires peuvent être différemment affectés dans les épilepsies du lobe temporal.

### I.3.3 Les O-LM

Ces cellules se caractérisent principalement par leur arborisation axonale très dense au niveau du *stratum lacunosum moleculare*, où se terminent les afférences en provenance du cortex entorhinal (Fig. 8C). Elles contactent les dendrites apicales des cellules pyramidales où elles forment des synapses GABAergiques (Ali and Thomson, 1998; Maccaferri et al., 2000) ainsi que d'autres interneurons (Katona et al., 1999). Le corps cellulaire de ces cellules se trouve dans le *stratum oriens* et leur arbre dendritique est confiné dans les régions où arborisent les récurrentes collatérales des cellules principales (Mcbain et al., 1994). Ainsi dans la région CA1 de l'hippocampe, les dendrites des O-LM sont horizontaux et confinés au niveau du *stratum oriens* où arborisent les récurrentes des cellules pyramidales de CA1 alors que dans la région CA3 les dendrites des O-LM arborisent à la fois dans les *strata oriens* et *radiatum*, là où se situent les récurrentes collatérales des cellules pyramidales de CA3 (Gulyas et al., 1993a). En utilisant un modèle d'ischémie qui entraîne la mort sélective des cellules pyramidales de CA1 tout en préservant les cellules pyramidales de CA3, il a été montré que 70% des synapses excitatrices qui contactent les O-LM dans la région CA1 proviennent des collatérales des cellules pyramidales de CA1 (Blasco-Ibanez and Freund, 1995). Les O-LM expriment la PV, mais plus faiblement que les cellules en panier PV+, et expriment également un neuropeptide : la somatostatine (Somogyi and Klausberger, 2005).

### I.3.4 Les interneurons bi-stratifiés

Ces cellules doivent leur nom à leur arborisation axonale qui se distribue au niveau des *strata oriens* et *radiatum* de part et d'autre du *stratum pyramidale* (Buhl et al., 1994a; Fig. 8D). Il occupe toute la largeur du *stratum oriens* et la partie la plus proximale du *stratum radiatum*. Le corps cellulaire des cellules bi-stratifiées se situe dans ou à proximité de la couche des cellules principales (Thomson et al., 2000). L'arbre dendritique de ces cellules est orienté radialement et traverse toutes les couches sauf le *stratum lacunosum moleculare* (Buhl et al., 1994a; Sik et al., 1995). Des études en microscopie électronique ont confirmé que ces cellules formaient principalement des contacts avec les dendrites des cellules principales (79%) mais assez peu au niveau du corps cellulaire (4%) (Halasy et al., 1996). Avec 6.7 contacts formés en moyenne au niveau des cellules principales, un neurone bistratifié pourrait contacter 2500 cellules pyramidales (Sik et al., 1995).

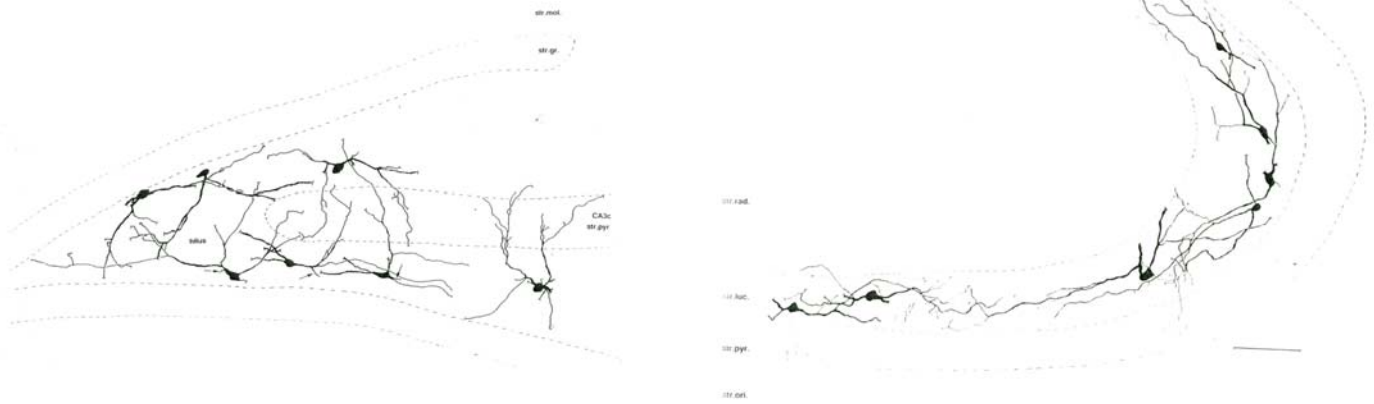
### I.3.5 Les interneurones tri-laminaires

On distingue deux types de cellules tri-laminaires, les cellules tri-laminaires ayant une arborisation dendritique horizontale (Sik et al., 1995) et celles ayant une arborisation dendritique verticale (Pawelzik et al., 2002). Le corps cellulaire des cellules tri-laminaires horizontales se situe à la limite entre le *stratum oriens* et l'*alveus* (OA interneurones). Les dendrites sont horizontaux et confinés dans cette zone (Sik et al., 1995). Les cellules tri-laminaires verticales sont plus semblables aux cellules bi-stratifiées. Leur corps cellulaire se situe dans ou à proximité de la couche des cellules pyramidales. Leur dendrite est orienté radialement mais, à la différence des cellules bi-stratifiées, il pénètre le *stratum lacunosum moleculare* suggérant une possible activation de ces cellules par les afférences du cortex entorhinal. L'axone de cellules arborise dans les *strata pyramidale, oriens* et *radiatum* d'où leur nom.

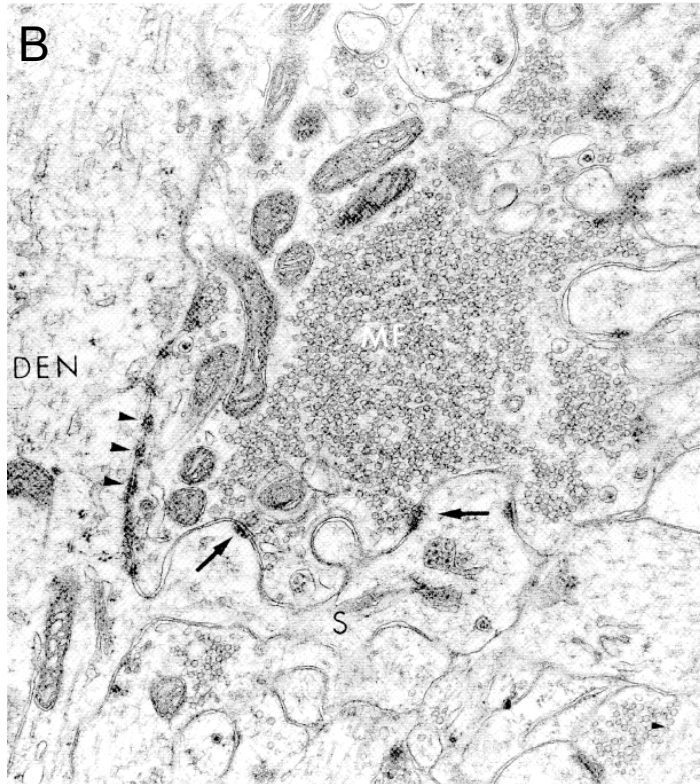
### I.3.6 Les interneurones associés aux collatérales de Schaffer

Ces cellules ont un corps cellulaire dans le *stratum radiatum* et à la bordure avec le *stratum lacunosum moleculare*. Elles innervent les cellules principales de CA1 au niveau de leur dendrite apical et, dans une moindre mesure, basal en association avec les collatérales de schaffer (Fig. 8E). Leurs dendrites sont principalement confinés au *stratum radiatum* mais peut traverser toutes les couches jusqu'à l'*alveus* (Vida et al., 1998; Pawelzik et al., 2002; Cossart et al., 1998). Ces cellules activent des récepteurs GABA<sub>A</sub> au niveau des

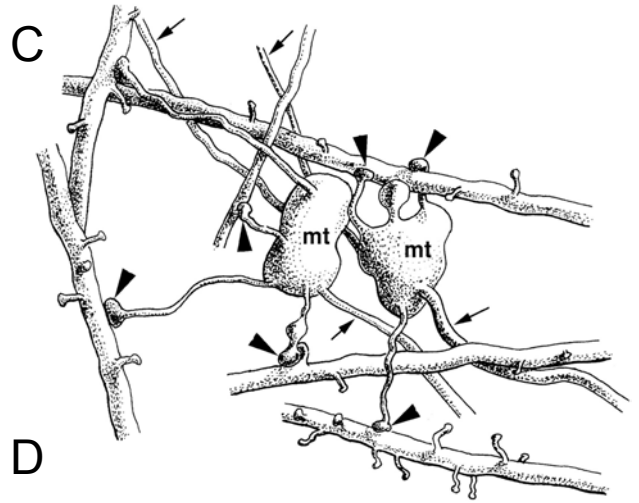
A



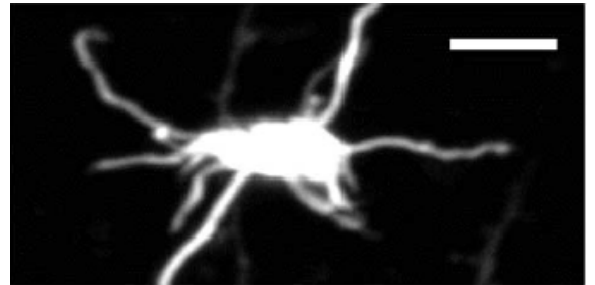
B



C



D



SO: *Stratum Oriens*, SO: *Stratum Pyramidale*, SL: *Stratum Lucidum*, SR: *Stratum Radiatum*,  
LM: *Stratum Lacunosum Moleculare*

## Figure 9. Interneurones associés aux fibres moussues

- A. Interneurones épineux dans le hilus et le stratum lucidum de la région CA3
- B. Le bouton synaptique moussu avec plusieurs zones actives (flèches).
- C. Schéma des connections entre les boutons moussus et les interneurones épineux par l'intermédiaire de filopodes.
- D. Filopodes moussus visualisés par imagerie bi-photonique.

D'après Gulyas et al., 1992 (A); Amaral and Dent., 1981 (B); Acsady et al., 1996 (C); Tashiro et al., 2003 (D)

cellules pyramidales et des interneurones. En plus de la CCK, certaines d'entre-elles expriment la calbindine. Ces cellules sont principalement activées de façon *feed-forward* par les collatérales de Schaffer dans la région CA1 (Pawelzik et al., 2002).

#### I.3.7 Les interneurones du *stratum lacunosum moleculare* associés à la voie perforante

Le corps de ces cellules est situé dans le *stratum lacunosum moleculare* à la limite du *stratum radiatum*. Leur arbre dendritique, généralement bipolaire, est principalement orienté horizontalement. Certaines branches traversent cependant le *stratum radiatum* pour atteindre le *stratum pyramidale* tandis que d'autre traversent la fissure hippocampique pour atteindre le *stratum moleculare* du gyrus dente. L'axone, également orienté horizontalement, arborise principalement dans le *stratum lacunosum moleculare* (Fig. 8F; Vida et al., 1998).

#### I.3.8 Les interneurones associés au système des fibres moussues

On distingue trois grands types de synapses formées par les fibres moussues : (1) les boutons synaptiques géants, formés au niveau des excroissances épineuses des cellules moussues du hilus et des cellules pyramidales de la région CA3, qui contiennent plusieurs zones actives (14 en moyenne Amaral and Dent, 1981; Fig. 9B); (2) des boutons synaptiques plus petits formés au niveau des interneurones du hilus et de la région CA3; (3) des synapses formées également sur les interneurones épineux du hilus et du stratum lucidum de la région CA3 mais par l'intermédiaire de filopodes qui s'étendent à partir des boutons synaptiques moussus géants (Acsady et al., 1998; Tashiro et al., 2003; Fig. 9C et D). Chaque cellule granulaire contacte un plus grand nombre d'interneurones inhibiteurs que de cellules excitatrices. Ainsi, dans le hilus, chaque fibre moussue contacte environ 10 cellules moussues, mais forme 140 à 150 synapses avec les interneurones inhibiteurs du hilus (Acsady et al., 1998). De même, dans la région CA3, une fibre moussue contacte un petit nombre de cellules pyramidales de CA3 (entre 10 et 18) en formant un seul bouton synaptique par cellule pyramidale en moyenne, mais forme entre 40 et 50 synapses avec les interneurones du *stratum lucidum*. Donc l'activation de la voie des fibres moussues aurait un effet globalement inhibiteur au niveau du hilus et de la région CA3 de l'hippocampe. Cependant, comme les cellules pyramidales de CA3 reçoivent les afférences d'une cinquantaine de cellules granulaires, on peut imaginer que la coactivation d'un ensemble de cellules granulaires aura un effet excitateur important sur un petit nombre de cellules pyramidales de la région CA3

tout en inhibant la majeure partie d'entre-elles (Henze et al., 2000; Lawrence and Mcbain, 2003).

Récemment, deux types d'interneurones ayant des relations anatomiques privilégiées avec le système des fibres moussues ont été décrits. Le premier type d'interneurone se caractérise par un corps cellulaire et un arbre dendritique entièrement contenu dans les zones où arborisent les fibres moussues : le *hilus* du gyrus denté et le *stratum lucidum* dans la région CA3 (Gulyas et al., 1992; Soriano and Frotscher, 1993; Fig. 9A). Ces neurones ne sont pas observés dans la région CA1 de l'hippocampe (Gulyas et al., 1992). Une autre caractéristique importante de ces cellules est le fait que leur arbre dendritique est entièrement couvert d'épines (Gulyas et al., 1992; Soriano and Frotscher, 1993). Ces cellules peuvent être identifiées par le fait qu'elles expriment spécifiquement une protéine chélatrice du calcium : la calrétinine en association avec un neuropeptide : la somatostatine (Gulyas et al., 2003). Dans le gyrus denté, l'axone de ces neurones arborise dans le *hilus* et dans le *stratum moleculare*. Dans la région CA3, leur axone arborise principalement dans le *stratum lucidum* et le *stratum radiatum* mais peut traverser le *stratum pyramidale* pour rejoindre le *stratum oriens* (Martinez et al., 1999; Spruston et al., 1997). Ces cellules seraient une cible privilégiée des fibres moussues (Acsady et al., 1998). Une étude récente montre également qu'une partie de ces cellules pourraient projeter en dehors de l'hippocampe vers le septum où elles contacteraient principalement des interneurones (Gulyas et al., 2003). Le second type d'interneurone a été récemment observé dans le *stratum lucidum* de la région CA3 (Vida and Frotscher, 2000). Le corps cellulaire de ces neurones est également contenu au niveau du *stratum lucidum* mais, contrairement au premier type, les dendrites de ces neurones sont lisses (sans épines) et orientées radialement. Ainsi elles traversent toutes les couches de l'hippocampe du *stratum oriens* au *stratum lacunosum moleculare*. Ce qui fait leur singularité est leur arborisation axonale étendue qui recouvre très précisément le *stratum lucidum* de la région CA3 (Vida and Frotscher, 2000). A ce niveau, ils forment des synapses inhibitrices GABAergiques avec les dendrites des cellules pyramidales de CA3.

### I.3.9 Les cellules hippocampo-septales

Ces cellules innervent principalement d'autres interneurones dans différentes régions de la formation hippocampique et dans le septum median (Gulyas et al., 2003). Dans le *stratum oriens* des régions CA1 et CA3, ces cellules ont des dendrites horizontaux et expriment la somatostatine et la calbindine mais pas la calrétinine. Dans le *stratum lucidum* de

la région CA3 et dans le *hilus* ces cellules expriment la somatostatine et la calrétinine et correspondent aux interneurons ayant des dendrites couverts épines (Gulyas et al., 2003).

#### I.3.10 Les cellules interneurons spécifiques de type 1 (IS-1)

Ces cellules sont immunopositives pour la calrétinine et faiblement pour les récepteurs mGluR1 $\alpha$  (voire chapitre II) mais, contrairement aux interneurons associés au système des fibres moussues, elles n'expriment pas la somatostatine et leurs dendrites sont lisses. On trouve leurs corps cellulaires dans toutes les couches de la formation hippocampique et leurs dendrites arborescent principalement au niveau du *stratum lucidum*, du *stratum radiatum* et du *stratum oriens* (Gulyas et al., 1996). Ces cellules seraient principalement activées par les collatérales de Schaffer dans la région CA1 et par les fibres associatives commissurales dans la région CA3 (Acsády et al., 1996b; Gulyas et al., 1996). Une des caractéristiques de ces dendrites est qu'ils sont en contact étroit entre-eux parfois sur plus de 100  $\mu$ m de longueur. A ce niveau, des images de microscopie électronique montrent des zonula adhérentia au niveau desquelles on observe parfois des jonctions communicantes (Gulyas et al., 1996). Leur axone est principalement observé au niveau des *strata radiatum* et *lucidum*, mais peut parfois innervier le *stratum pyramidale* et le *stratum oriens*. Cet axone contacte exclusivement d'autres interneurons souvent du même type mais aussi des cellules en panier contenant la CCK et des interneurons contenant la calbindine.

#### I.3.11 Les cellules interneurons spécifiques de type 2 (IS-2)

Ces cellules ont un corps cellulaire au niveau du *stratum radiatum* à la limite du *stratum lacunosum moleculare*. Elles expriment le peptide vasoactif intestinal (VIP+) mais pas la calrétinine (CR-). Leurs dendrites sont restreints au *stratum lacunosum moleculare* où ils arborescent généreusement (Acsády et al., 1996b; Acsády et al., 1996a). Ces cellules seraient donc préférentiellement activées par les fibres en provenance du cortex entorhinal (ibid). Leur axone, organisé en branches perpendiculaires à la couche des cellules principales, innerve exclusivement le *stratum radiatum*. Les cellules IS-2 forment des synapses GABAergiques avec des interneurons du même type, les interneurons IS-1, et avec des interneurons contenant la calbindine dans le *stratum radiatum* (ibid). Un autre type de cellule IS-2 a été décrit. Leur corps cellulaire se trouve dans le *stratum pyramidale* et leur arbre

dendritique, perpendiculaire à la couche des cellules principales, traverse toutes les couches jusqu'au *stratum lacunosum moleculare* (Gulyas et al., 1996).

#### I.3.12 Les cellules interneurones spécifiques de type 3 (IS-3)

Ces cellules sont à la fois VIP+ et CR+. Leur corps cellulaire se situe dans la couche des cellules pyramidales ou dans le *stratum radiatum* au niveau de l'hippocampe et dans la couche des cellules granulaires ou dans le *stratum moleculare* dans le gyrus denté. Leur dendrite apical monte verticalement jusqu'au *stratum lacunosum moleculare* où il arborise en un certain nombre de collatérales (Acsady et al., 1996b; Acsady et al., 1996a). Leurs axones se dirigent directement vers le *stratum oriens* où ils arborisent abondamment. A ce niveau, ils forment de nombreuses synapses GABAergiques avec les dendrites des interneurones O-LM qui y arborisent (Acsady et al., 1996a; Ferraguti et al., 2004). Ces interneurones pourraient être principalement activés par les fibres en provenance du cortex entorhinal et contrôler en retour, par l'intermédiaire des O-LM, l'arrivée d'information en provenance du cortex entorhinal au niveau des cellules pyramidales (Acsady et al., 1996b; Acsady et al., 1996a).

### I.4. Principales afférences et efférences de la formation hippocampique

#### I.4.1. Afférences externes

Comme nous l'avons vu, les cellules principales sont principalement contactées par des afférences en provenance de l'hippocampe contra-latéral, du cortex entorhinal. En plus de ces afférences, les cellules de l'hippocampe reçoivent des afférences en provenance de plusieurs grands systèmes neuromodulateurs : (i) des afférences *cholinergiques* en provenance du septum médian. Ces afférences contactent principalement des cellules principales au niveau du gyrus denté et de l'hippocampe. Seules 5 à 10 % des cibles seraient des interneurones. Ces afférences joueraient un rôle dans la genèse des rythmes thêta au sein de la formation hippocampique (activités synchrones ayant une fréquence moyenne autour de 8-10 Hz). (ii) Des afférences *sérotoninergiques* qui proviennent principalement du noyau médian du raphé mais également du noyau dorsal (Lidov et al., 1980; Kosofsky and Molliver, 1987; Tork, 1990). Ces afférences projettent principalement dans la région sous-granulaire du gyrus denté et au niveau du *stratum lucidum* de la région CA1. (iii) Des afférences *noradrénergiques* en provenance du *locus coeruleus*, particulièrement dense dans les régions

contactées par les fibres moussues : le *hilus* du gyrus denté et le *stratum lucidum* de la région CA3 ainsi qu'au niveau du *stratum lacunosum moleculare* de la région CA1 (Loy et al., 1980; Morrison et al., 1979; Oleskevich et al., 1989; Moudy et al., 1993). D'autres afférences proviennent des corps supramammillaires qui forment une bande dense au niveau de la couche moléculaire interne du gyrus denté et le *stratum oriens* des régions CA3a et CA2 (Stanfield and Cowan, 1984; Vertes, 1992; Magloczky et al., 1994). Ces afférences contactent principalement le corps cellulaire et les dendrites des cellules granulaires. Enfin, la formation hippocampique reçoit des afférences histaminergiques en provenance des noyaux tuberomammillaires (Panula et al., 1989), dopaminergiques en provenance de l'aire tegmentale ventrale (Verney et al., 1985) et des afférences amygdaliennes au niveau de la région CA1 (Caffe et al., 1987).

#### I.4.2. Efférences

En plus des projections déjà décrites vers l'hippocampe contra-latéral et le subiculum, la principale voie efférente de l'hippocampe est le fornix qui prolonge la fimbria. Cet important réseau de fibres sur la face dorsale de la formation hippocampique chez l'homme (Fig. 1A et B) projette vers différentes structures du système nerveux comme le noyau accumbens, la formation réticulée, l'aire préoptique et le tronc cérébral.



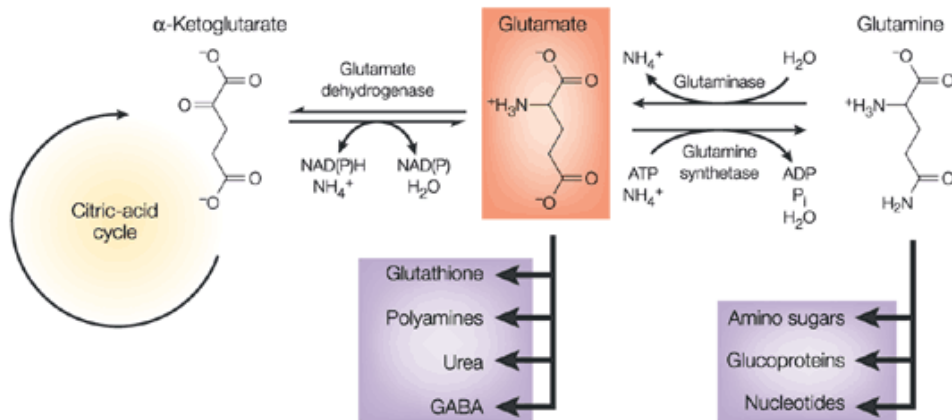
## Chapitre II : Transmission synaptique glutamatergique

Le terme de synapse a été introduit au début du XX<sup>ème</sup> siècle par Charles Sherrington pour décrire la zone spécialisée au niveau de laquelle un neurone communique avec un autre neurone. Ces zones spécialisées avaient précédemment été observées et décrites par Ramon y Cajal. Initialement, on pensait que la communication entre les neurones se faisait électriquement. Mais en 1920, Otto Loewi démontre qu'une substance *chimique*, l'acétylcholine, peut transmettre un signal entre le nerf vagal et le cœur. Dès lors, deux écoles s'opposent sur la nature de la transmission synaptique: d'un côté les physiologistes emmenés par John Eccles, un élève de Sherrington, défendent la thèse de la communication électrique. De l'autre, les pharmacologistes, emmenés par Henry Dale, postulent que la transmission synaptique est principalement chimique. Lorsque les techniques d'enregistrement électrophysiologiques s'améliorent dans les années 1950 et 1960, il apparaît que les deux formes de communication synaptique coexistent dans le système nerveux, même si la plupart des synapses utilisent des transmetteurs de type chimique. Au niveau des synapses chimiques, les neurones pré- et post-synaptiques sont séparés par un espace visible en microscopie électronique : la fente synaptique. Un changement de potentiel dans la cellule pré-synaptique entraîne la libération d'une substance chimique appelée *neurotransmetteur* dans la fente synaptique. Ce transmetteur va diffuser pour se lier à des protéines réceptrices dans la membrane de la cellule post-synaptique. Cette liaison entraîne par la suite, directement ou indirectement, l'ouverture de canaux dans la membrane synaptique qui permettent le passage sélectif d'ions, ce qui modifie le potentiel de la cellule post-synaptique. Dans ce chapitre nous allons nous intéresser aux synapses glutamatergiques qui utilisent un acide aminé, le glutamate, comme neurotransmetteur.

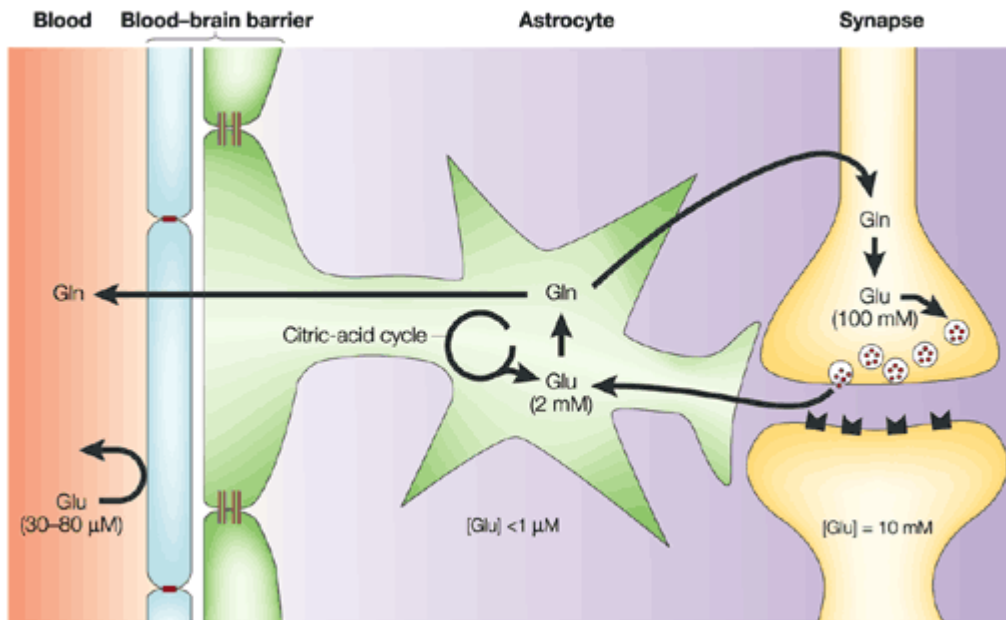
## II.1. Synthèse, libération et recapture du glutamate

On distingue principalement deux grands types de synapses chimiques dans le système nerveux : les synapses excitatrices et les synapses inhibitrices. L'activation des synapses excitatrices dépolarise le neurone post-synaptique et favorise l'émission d'un potentiel d'action tandis que l'activation des synapses inhibitrices hyperpolarise le neurone post-synaptique diminuant sa probabilité d'émettre un potentiel d'action. Ces deux types de synapses peuvent être distingués d'un point de vue morphologique en microscopie électronique : les synapses excitatrices (dites de type I) présentent un épaississement au

A



B



**Figure 10. Métabolisme et compartimentalisation du glutamate dans le système nerveux**

A. Principales voies métaboliques dans lesquelles le glutamate est impliqué.  
 B. Le glutamate est principalement synthétisé dans les astrocytes dans le système nerveux.

niveau post-synaptique plus important qu'au niveau pré-synaptique et sont dites *asymétriques* tandis que les synapses inhibitrices (de type II) présentent un épaississement identique aux niveaux pré- et post-synaptiques et sont dites *symétriques* (GRAY, 1963). La nature excitatrice ou inhibitrice d'une synapse ne dépend pas de la nature du neurotransmetteur qu'elle utilise mais plutôt de la perméabilité ionique des récepteurs activés par ce neurotransmetteur et du gradient électrochimique de l'ion. Dans le système nerveux central des vertébrés adultes, la plupart des synapses excitatrices contiennent des récepteurs à un acide aminé : le glutamate tandis que les synapses inhibitrices contiennent des récepteurs à l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique (GABA). Mais chez le jeune, les synapses GABAergiques sont excitatrices car le gradient électrochimique du chlore est inversé (Ben Ari et al., 1989; Ben Ari, 2002). Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus largement utilisé dans le système nerveux central.

### II.1.1 Synthèse du glutamate

Contrairement à d'autres neurotransmetteurs, le glutamate participe à des voies métaboliques ubiquitaires et est donc présent dans toutes les cellules. Le glutamate ne peut traverser la barrière hémato-encéphalique, donc les niveaux de glutamate présents dans le cerveau sont dus à une synthèse locale (Hertz et al., 1999). Le glutamate peut être synthétisé à partir du glucose dans le cycle de Krebs par trans-amination de l' $\alpha$ -cétoglutarate mais la plupart du glutamate libéré par les neurones est synthétisé à partir de la glutamine (Hamberger et al., 1979; Thanki et al., 1983 voir Fig. 10A). La glutamine n'est pas directement synthétisée dans les neurones mais dans les astrocytes. En effet, les astrocytes recapturent le glutamate libéré par les neurones (Chaudhry et al., 1995; Rothstein et al., 1994) et le transforment en glutamine via la glutamine synthase. La glutamine est ensuite transportée depuis les cellules gliales jusque dans les terminaisons synaptiques (Broer and Brookes, 2001; Chaudhry et al., 2002) où elle est convertie en glutamate par la glutaminase (pour revue voir Nedergaard et al., 2002; Fig. 10B). Contrairement à d'autres neurotransmetteurs de type neuropeptide, synthétisés au niveau du corps cellulaire, le glutamate est donc principalement synthétisé localement au niveau des terminaisons synaptiques (Fig. 10B).

### II.1.2. Stockage du glutamate dans les vésicules synaptiques

Comme la plupart des neurotransmetteurs classiques, le glutamate est stocké à forte concentration (~60mM) dans des vésicules au niveau des terminaisons pré-synaptiques (Storm-Mathisen et al., 1983; Burger et al., 1989) et est libéré par exocytose par un processus calcium-dépendant (voir ci-dessous). L'accumulation du glutamate dans les vésicules synaptiques est un processus coûteux en énergie dépendant d'un gradient électrochimique en ions  $H^+$ . Une ATPase vésiculaire, la V-ATPase, utilise l'énergie libérée par hydrolyse de l'ATP cytoplasmique pour créer un gradient en ions  $H^+$  (Forgac, 2000). Ce gradient électrochimique est ensuite utilisé par des transporteurs spécifiques du glutamate (VGLUT) pour le faire entrer dans les vésicules contre son gradient de concentration. On distingue trois isoformes de la protéine VGLUT : VGLUT1, 2 et 3 (pour revue voir (Fremeau, Jr. et al., 2004)). L'expression de ces différentes isoformes est complémentaire : VGLUT1 est principalement exprimé au niveau du cortex, dans l'hippocampe et dans le cervelet tandis que VGLUT2 est exprimé au niveau du tronc cérébral, dans le thalamus et dans les noyaux gris centraux (Fremeau, Jr. et al., 2001; Varoqui et al., 2002; Herzog et al., 2001). Au niveau de la formation hippocampique, la plupart des terminaisons synaptiques excitatrices présentent un marquage pour VGLUT1 (Bellocchio et al., 1998). Seules les cellules pyramidales de la région CA2 présentent un marquage pour VGLUT2. Un marquage VGLUT2 est aussi présent au niveau de la couche granulaire du gyrus denté mais les corps cellulaires des cellules granulaires ne sont pas marqués (Fremeau, Jr. et al., 2001). VGLUT3 est exprimé par certains interneurons inhibiteurs de l'hippocampe notamment ceux exprimant la CCK (voir chapitre I (Fremeau, Jr. et al., 2002)). L'expression de VGLUT1 et VGLUT2 au niveau de synapses spécifiques a aussi été corrélée à leur probabilité de libération. Ainsi, les synapses ayant une faible probabilité de libération exprimeraient VGLUT1 tandis que celles ayant une forte probabilité de libération exprimeraient VGLUT2 (Fremeau, Jr. et al., 2004).

### II.1.3. Libération du glutamate dans la fente synaptique

On distingue deux modes de libération du glutamate vésiculaire. Le premier que nous appellerons «libération spontanée» est liée à la dépolarisation de l'élément pré-synaptique suite à l'arrivée d'un potentiel d'action. Le second, que nous appellerons «libération miniature» intervient indépendamment des potentiels d'actions.

#### II.1.3.1 La libération de neurotransmetteurs est quantique

Les neurotransmetteurs sont stockés dans des vésicules, chacune contenant environ 5000 molécules. La libération de l'ensemble des molécules de neurotransmetteur contenu dans une vésicule produit un événement post-synaptique de taille unique appelé *événement synaptique quantique*. Paul Fatt et Bernard Katz furent les premiers à entrevoir la nature quantique de la transmission synaptique. Au cours d'enregistrements de la synapse motrice de batracien, ils observèrent des potentiels synaptiques de petite taille, en l'absence de potentiel d'action, qu'ils appelèrent *potentiels miniature* (Fatt and Katz, 1952). Ces potentiels ont ensuite été observés, dans les mêmes conditions, au niveau des synapses motrices de mammifères et dans les neurones centraux. Au niveau de la jonction neuromusculaire, ces potentiels ont une taille unique et correspondent à la libération du contenu d'une vésicule pré-synaptique soit un *quantum* de neurotransmetteurs. Del Castillo et Katz se sont ensuite demandés si la libération de neurotransmetteurs suite à l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau pré-synaptique était aussi composée de quanta. Pour répondre à cette question ils se placèrent dans des conditions où la transmission synaptique est réduite et stimulèrent l'axone d'un seul motoneurone (*stimulations minimales*). Dans ces conditions ils observèrent une réduction de l'amplitude de la réponse évoquée. De plus, l'amplitude de cette réponse variait d'une stimulation à l'autre et souvent aucune réponse n'était observée (*échecs de la transmission synaptiques* ou *failures*). Cependant, la plus petite réponse observée avait une taille unique (de l'ordre de 0.5 mV) correspondant à la taille des *potentiels miniatures* et les potentiels plus grands avaient une taille proportionnelle à celle du potentiel unitaire (Del Castillo and Katz, 1954). Ils conclurent que le contenu d'une vésicule synaptique peut être libéré indépendamment d'un potentiel d'action dans la fente synaptique pour générer un *événement synaptique miniature*. La dépolarisation de l'élément pré-synaptique, provoquée par un potentiel d'action, permet la libération de plusieurs quanta de neurotransmetteurs et génère ce que nous appellerons un *événement synaptique spontané*. Le nombre de quanta libéré dépend de  $n$ , le nombre de vésicules disponibles pour être libérées et de  $p$ , la probabilité que ces vésicules soient effectivement libérées :  $m = np$ . Au niveau d'une synapse excitatrice du système nerveux central, on estime qu'un potentiel d'action libère en moyenne deux vésicules. Même si la nature quantique de la transmission synaptique a été démontrée pour toutes les synapses explorées à ce jour, le modèle classique de la transmission synaptique décrit par Katz et ses collègues au niveau de la jonction neuromusculaire est parfois difficile à appliquer aux synapses du système nerveux central. En effet, les événements miniatures enregistrés au niveau d'un neurone du système nerveux central n'auront pas la même amplitude car ils proviennent de synapses différentes. Ces synapses peuvent différer en terme

de nombre de vésicules susceptibles d'être libérées et en terme de probabilité de libération de ces vésicules. De plus, ces différentes synapses peuvent activer des récepteurs post-synaptiques ayant des propriétés différentes. Ainsi, l'étude des propriétés quantiques de la transmission synaptique est souvent plus difficile au niveau des synapses du système nerveux central.

#### II.1.3.2 Rôle de la dépolarisation de l'élément pré-synaptique

Nous allons maintenant nous intéresser à la séquence d'événements qui entraîne la libération de neurotransmetteur suite à l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau pré-synaptique. Les travaux de Bernard Katz et Ricardo Miledi au niveau de la synapse géante du calamar ont permis de montrer que le premier élément essentiel était la dépolarisation de l'élément pré-synaptique suite à l'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants. Si l'ouverture de ces canaux est bloquée par la tétrodotoxine (TTX), la transmission synaptique évoquée par stimulation de l'axone est bloquée. Mais, même en présence de TTX, la transmission synaptique peut être évoquée en dépolarisant directement la terminaison synaptique. La libération miniature de glutamate ne nécessite pas une dépolarisation de l'élément pré-synaptique (Katz and Miledi, 1967).

#### II.1.3.3 Rôle d'une augmentation locale de la concentration en calcium au niveau pré-synaptique

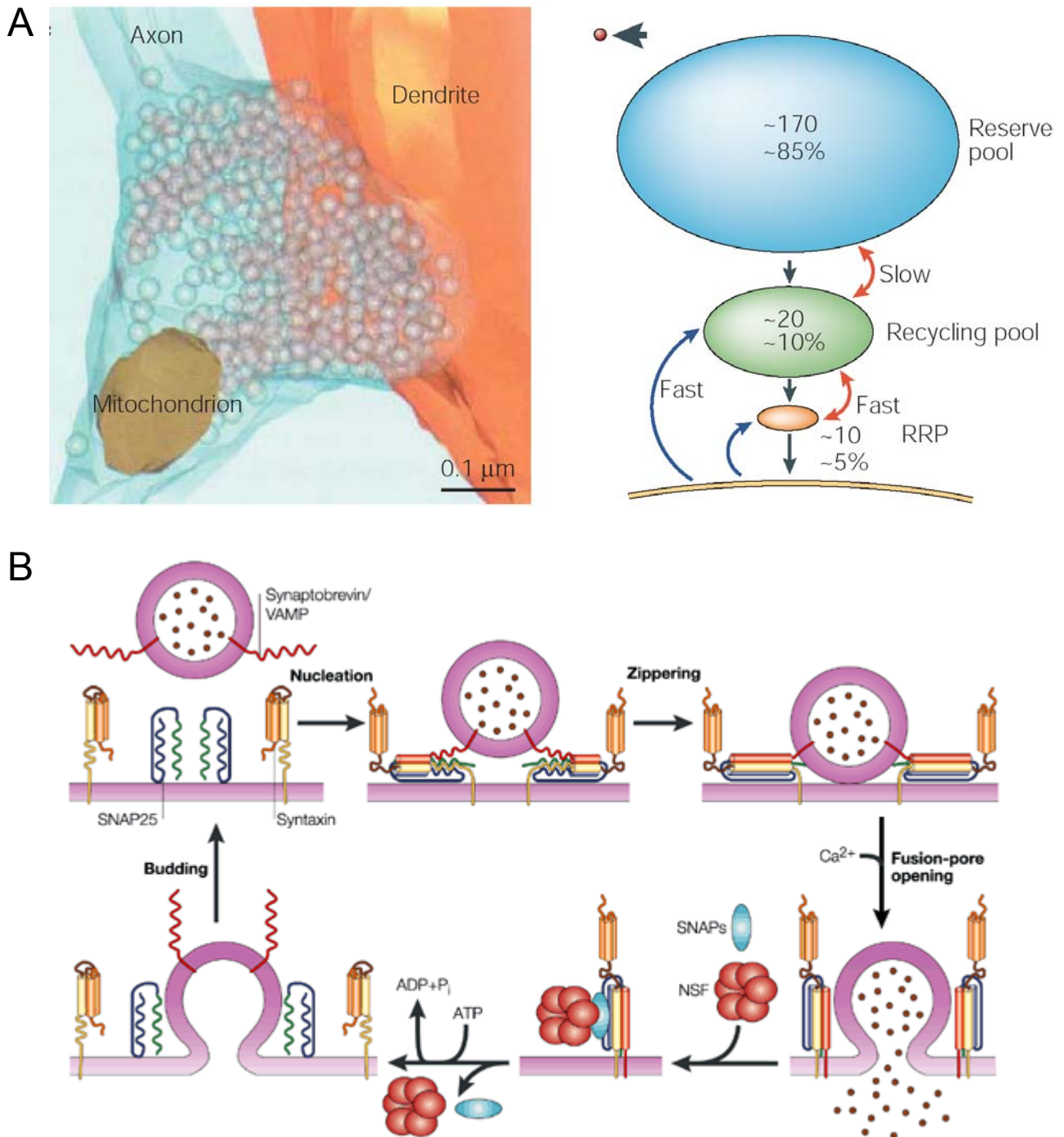
Le second élément essentiel à la libération de neurotransmetteurs est une augmentation de la concentration en calcium au niveau de l'élément pré-synaptique. Katz avait déjà observé les effets modulateurs de la concentration extracellulaire en calcium sur la transmission synaptique. La mise en évidence directe d'une entrée de calcium au niveau pré-synaptique suite à l'arrivée d'un potentiel d'action provient des travaux de Rodolfo Llinas et de ses collègues. En enregistrant la terminaison pré-synaptique de la synapse géante du calamar (en voltage imposé), ces auteurs ont pu montrer qu'une dépolarisation progressive de la terminaison était associée à un courant entrant calcique de plus en plus grand au niveau pré-synaptique et à des événements synaptique d'une amplitude de plus en plus grande au niveau post-synaptique (Llinas et al., 1981). On sait aujourd'hui qu'au niveau du site de libération des vésicules synaptiques, la membrane de la terminaison pré-synaptique contient une très forte concentration de canaux calciques voltage-dépendants. Lorsque ces canaux s'ouvrent, ils

entraînent localement une très forte augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (plus de 1000 fois la concentration initiale) pour revue voir (Schneggenburger and Neher, 2005). On distingue différentes classes de canaux calciques qui ont des propriétés biophysiques, pharmacologiques et des fonctions physiologiques différentes. Dans l'hippocampe, la libération rapide de neurotransmetteur est principalement due à l'activation de deux grands types de canaux : les canaux de type P/Q (CaV2.1) et N (CaV2.2) (Luebke et al., 1993; Takahashi and Momiyama, 1993; Regehr and Mintz, 1994; Wheeler et al., 1994; Dietrich et al., 2003). Les *canaux calciques de type P/Q et N* nécessitent une forte dépolarisation pour être activés (voltages supérieurs à  $-40$  à  $-20$  mV) et font partie des canaux calciques à haut seuil d'activation. Ces canaux peuvent être différemment distribués au niveau de différentes afférences synaptiques dans l'hippocampe (Reid et al., 1997). Contrairement à la libération spontanée, la libération miniature est observée en absence de calcium dans le milieu extracellulaire et ne nécessiterait pas une entrée de calcium via les canaux calciques voltage-dépendants. Des études récentes montrent cependant qu'une partie de la libération miniature résulte de variations locales spontanées de la concentration intracellulaire en calcium, observées en l'absence de potentiel d'action et en l'absence de calcium extracellulaire. Ces variations sont dues à une libération du calcium stocké au niveau du réticulum endoplasmique lisse via l'activation de récepteurs sensibles à la ryanodine (Llano et al., 2000; Emptage et al., 2001) pour revue voir (Collin et al., 2005). Ces variations contribueraient également au signal calcique observé après invasion d'une extrémité pré-synaptique par un potentiel d'action et donc à la libération spontanée de neurotransmetteurs.

#### II.1.3.4 Différentes familles de vésicules synaptiques

Suite à une dépolarisation de l'élément pré-synaptique, toutes les vésicules ne fusionnent pas avec la membrane pré-synaptique. En fait, depuis les travaux pionniers de Birks et MacIntosh, on admet que les vésicules peuvent appartenir à différents groupes (Birks and Macintosh, 1957) dont les vésicules sont plus ou moins « disponibles » pour fusionner avec la membrane post-synaptique en réponse à une dépolarisation de l'élément pré-synaptique. Initialement, on distinguait un groupe de vésicules prêtent à fusionner (le « readily releasable pool » ou RRP) et un groupe de vésicules de réserve qui peuvent être libérées suite à une dépolarisation plus prolongée de l'élément pré-synaptique. Aujourd'hui, on distingue trois principaux groupes de vésicules: le RRP, le groupe de *vésicules de*





**Figure 11. Compartimentalisation et libération des vésicules synaptiques**

- A. Visualisation des vésicules synaptiques dans un bouton pré-synaptique.  
 B. Les vésicules se répartissent en différents groupes: le groupe de réserve (bleu), le groupe de recyclage (vert) et le groupe rapidement libéré (orange).  
 C. Etapes de libération et de recyclage des vésicules synaptiques grâce au complexe des SNAREs.

D'après Rizzoli et Betz, 2005 (A); Rizo et Südhö, 2002 (B)

*recyclage* et le groupe de *vésicules de réserve* (Regehr and Mintz, 1994; pour revue voir Rizzoli and Betz, 2005; Fig. 11A). Au niveau de neurones hippocampiques en culture, le nombre total de vésicule est de 100 à 200. Le RRP contient entre 5 et 20 vésicules qui peuvent être libérées par choc hypertonique (en utilisant une solution hyperconcentrée de sucrose par exemple) ou lors d'une stimulation de 2s à 20 Hz. Le groupe de recyclage contient 10 à 20 % des vésicules. Le reste des vésicules (la majorité) appartenant au groupe de réserve (Rizzoli and Betz, 2005).

Différentes familles de protéines interviennent au niveau des différents groupes de vésicules. Les vésicules du groupe de réserve ne se déplacent pas librement dans l'extrémité présynaptique mais sont engluées dans un réseau dense de neurofilaments par l'intermédiaire d'une famille de protéines de la membrane vésiculaire : les *synapsines* (Henkel et al., 1996; Kraszewski et al., 1996; Hilfiker et al., 1999). Lorsque ces protéines sont phosphorylées par l'intermédiaire de protéines kinases c-AMP-dépendantes et calcium-calmoduline-dépendantes elles libèrent des vésicules qui peuvent rejoindre les autres groupes de vésicules (Chi et al., 2003; Benfenati et al., 1992; Torri et al., 1992). Comme nous l'avons vu précédemment, les vésicules sont libérées au niveau de zones spécialisées de la membrane pré-synaptique qui sont particulièrement enrichies en canaux calciques voltage-dépendants. On les appelle les « *zones actives* ». Les vésicules libérées du groupe de réserve sont dirigées vers ces zones actives grâce à une autre famille de protéines de la membrane vésiculaire de la famille *ras* : les protéines *Rab3*. Ces protéines sont de petites GTPases et l'hydrolyse du GTP en GDP et en phosphate inorganique pourrait être importante pour l'adressage correct des vésicules au niveau de la zone active ou dans les dernières étapes de la transmission synaptique (Gonzalez, Jr. and Scheller, 1999; Geppert et al., 1994a; Geppert et al., 1997). Ces protéines pourraient également jouer un rôle dans les mécanismes d'expression de la LTP cAMP-dépendante au niveau des fibres moussues (Castillo et al., 1997a). Au niveau de la zone active, les vésicules du RRP sont maintenues à proximité des canaux calciques de façon à ce que les protéines responsables de la fusion et sensibles au calcium puissent détecter l'augmentation locale de la concentration en calcium (Neher, 1998). Le maintien des vésicules au niveau de la zone active dépendrait de l'interaction entre des protéines intégrées à la membrane de la vésicule (les vésicules-SNARES ou *v-SNARE*) et des vésicules spécifiques de la membrane post-synaptique (*t-SNARE*). Ces protéines forment un complexe stable qui maintient les vésicules du RRP au niveau de la zone active proche des canaux calciques voltage-dépendants (Rizo and Sudhof, 2002). On dit que les vésicules sont arrimées à la membrane (Fig. 11B) et prêtes à fusionner. En fait les vésicules du RRP correspondraient à ces vésicules arrimées (Heuser et

al., 1979; Ceccarelli and Hurlbut, 1980 mais voir Rizzoli and Betz, 2004). Une protéine intégrée à la membrane des vésicules synaptiques, la *synaptotagmine*, participerait au couplage entre l'augmentation locale de calcium et la fusion des vésicules arrimées (Robinson et al., 2002; Mackler et al., 2002). Chez des souris ayant une mutation dans le gène codant pour la synaptotagmine, la transmission synaptique miniature est peu modifiée tandis que la transmission synaptique spontanée est abolie (Geppert et al., 1994b; Reim et al., 2001).

#### II.1.5. Recapture du glutamate

Pour que le glutamate puisse jouer efficacement son rôle dans la transmission synaptique rapide, il ne doit pas rester trop longtemps dans la fente synaptique. Contrairement à d'autres neurotransmetteurs, le glutamate n'est pas inactivé par action enzymatique mais principalement par recapture grâce à des transporteurs membranaires spécifiques. Cinq transporteurs membranaires du glutamate (*EAAT* pour *Excitatory Amino Acid Transporter*) ont été clonés à l'heure actuelle : EAAT 1-5 (Anderson and Swanson, 2000; Gadea and Lopez-Colome, 2001; Danbolt, 2001). Ces récepteurs sont principalement exprimés dans les astrocytes mais le transporteur EAAT3 est exprimé dans les neurones glutamatergiques de l'hippocampe (Rothstein et al., 1994). La recapture du glutamate est couplée au transport d'ions sodiques et potassiques : l'entrée d'une molécule de L-glutamate est couplée à l'entrée de trois ions  $\text{Na}^+$  et d'un ion  $\text{H}^+$  et à la sortie d'un ion  $\text{K}^+$ . Des études *in vivo* sur des souris ayant des mutations au niveau de gènes codant spécifiquement pour différents sous-type de transporteurs au glutamate montrent que les transporteurs gliaux EAAT1 (GLAST) et EAAT2 (GLT1) sont principalement responsables de la recapture du glutamate de la fente synaptique (Rothstein et al., 1996). Ainsi, les astrocytes peuvent contrôler la concentration de glutamate au niveau de la fente synaptique et l'efficacité de la transmission synaptique glutamatergique (Oliet et al., 2001). Un mauvais fonctionnement de ces transporteurs peut avoir des conséquences pathologiques notamment chez le jeune (Demarque et al., 2004). Inversement, une augmentation du nombre de transporteurs peut protéger les neurones de l'excitotoxicité due à une augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate (Rothstein et al., 2005).

## II.2. Les récepteurs post-synaptiques au glutamate

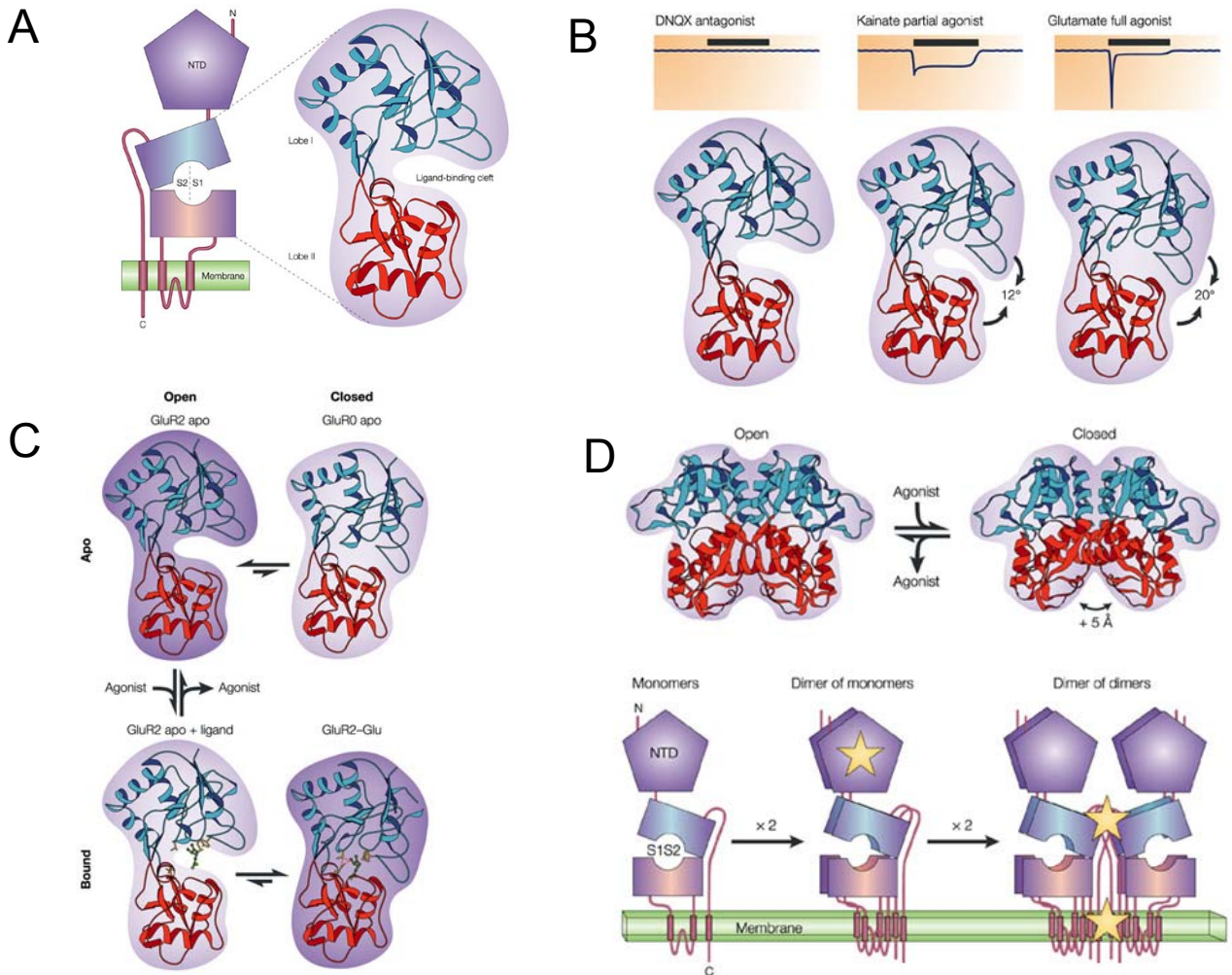
Après fusion des vésicules synaptiques avec la membrane pré-synaptique, le glutamate libéré se fixe sur des récepteurs spécifiques présents au niveau de la membrane post-synaptique. On distingue deux grandes familles de récepteurs au glutamate. La première famille correspond à des récepteurs canaux qui, lorsqu'ils sont activés par fixation du glutamate, s'ouvrent pour laisser passer des ions de part et d'autre de la membrane plasmique. On parle de *récepteurs ionotropiques*. L'action excitatrice du glutamate, connue depuis les travaux de Curtis sur les neurones de la moëlle épinière, est principalement due à l'ouverture de ces récepteurs canaux post-synaptiques (Curtis et Watkins, 1960). Ces récepteurs sont principalement impliqués dans la transmission synaptique excitatrice rapide dans le SNC (Fonnum, 1984). A côté de ces récepteurs, il existe des récepteurs au glutamate qui modifient l'activité des neurones post-synaptiques indirectement, en activant des cascades de seconds messagers intracellulaires. Ces récepteurs sont appelés *récepteurs métabotropiques*. Leur action peut être excitatrice ou inhibitrice en fonction de la perméabilité ionique des canaux qu'ils activent. Dans cette partie nous allons brièvement décrire les caractéristiques pharmacologiques et moléculaires de ces deux grands types de récepteurs au glutamate puis nous reviendrons plus en détail sur les caractéristiques fonctionnelles des récepteurs kainate dans le chapitre III.

### II.2.1. Les récepteurs ionotropiques

#### II.2.1.1. Propriétés générales

##### II.2.1.1.1. Pharmacologie

Dans les années 1970, les travaux de Jeffrey Watkins et de ses collègues permirent d'identifier différents groupes de récepteurs ionotropiques au glutamate grâce à l'utilisation d'agonistes exogènes les activant différenciellement. Ils distinguèrent ainsi les récepteurs activés préférentiellement par le quisqualate, par l'acide kaïnique (KA) et par le NMDA (Watkins et al., 1990; Watkins et Evans, 1981). Par la suite, il s'est avéré que le quisqualate activait aussi des récepteurs glutamatergiques métabotropiques et les « récepteurs au quisqualate » ont été renommés en fonction d'un agoniste plus sélectif : l'AMPA. Ces récepteurs ont également des antagonistes sélectifs permettant de les bloquer sélectivement.



**Figure 12. Structure et fonctionnement des récepteurs ionotropiques glutamatergiques**

- A. Structure du récepteur ionotrope glutamatergique.
- B. Le degré d'ouverture du « coquillage » S1S2 détermine l'efficacité du couplage fixation du ligand-ouverture du canal.
- C. Equilibres conformationnels du « coquillage » S1S2.
- D. Dimérisation des complexes S1S2 (haut) et des récepteurs ionotropiques (bas).

D'après Madden., 2002; Gouaux., 2004; Mayer., 2005

Ainsi les récepteurs NMDA peuvent être spécifiquement bloqués par l'APV tandis que les récepteurs AMPA et KA peuvent être sélectivement bloqués par le CNQX. L'absence d'antagoniste permettant de bloquer sélectivement les récepteurs AMPA ou KA a longtemps empêché l'étude de leurs propriétés physiologiques spécifiques. C'est pourquoi ces deux récepteurs ont longtemps été regroupés sous le nom de récepteurs glutamatergiques ionotropiques « non-NMDA » ou récepteurs AMPA/KA. Récemment, des antagonistes de la famille des 2,3 benzodiazépines ont été synthétisés et ont permis de caractériser les propriétés physiologiques des récepteurs KA et des récepteurs AMPA séparément (Paternain et al., 1995 ; Voir Chapitre III).

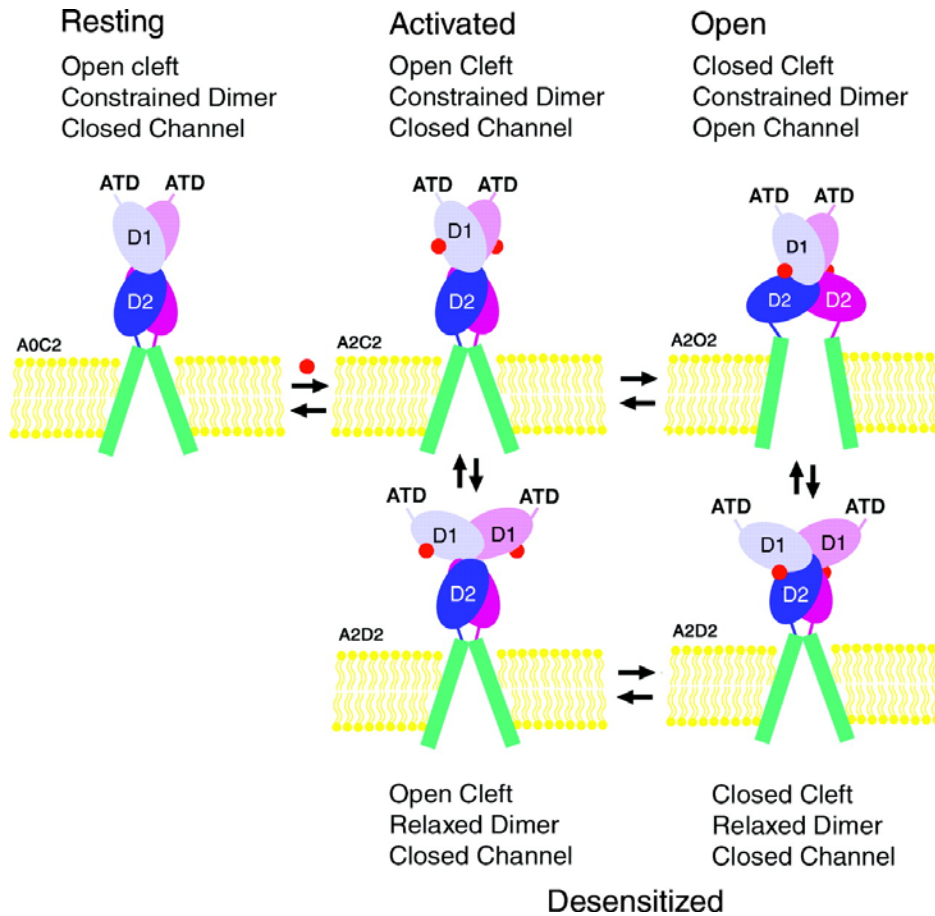
#### II.2.1.1.2. Structure des récepteurs ionotropiques glutamatergiques

Les progrès de la biologie moléculaire dans les années 1980 et l'utilisation de *vecteurs d'expression hétérologues* tels que les ovocytes de Xénope où les cellules HEK-293 ont permis de cloner les gènes codant pour les récepteurs ionotropiques glutamatergiques. Aujourd'hui, on en distingue 18 regroupés en quatre grandes familles en fonction d'homologies de séquences (Wisden and Seeburg, 1993b; Hollmann and Heinemann, 1994; Dingledine et al., 1999). Trois familles codent pour les trois grands types de récepteurs définis grâce aux outils pharmacologiques de Watkins : AMPA (GluR1-4), KA (GluR5-7, KA1 et KA2) et NMDA (NR1, NR2A-D, NR3A et NR3B). La dernière pour une famille de récepteurs  $\delta$  orphelins. Chacun de ces gènes code pour une sous-unité et l'assemblage de quatre sous-unités au sein d'une même famille permet de former un récepteur ionotropique glutamatergique fonctionnel *in vivo* (Rosenmund et al., 1998; Ayalon and Stern-Bach, 2001; Madden, 2002). Le fait que les récepteurs ionotropiques glutamatergiques soient formés de quatre sous-unités les distingue de la plupart des autres récepteurs ionotropiques pentamériques et suggère une divergence précoce pendant l'évolution (Chen et al., 1999). Chaque sous-unité est une protéine transmembranaire contenant trois segments transmembranaires (TM1, TM3 et TM4) et un segment pseudo-transmembranaire (TM2; Hollmann et al., 1994; Fig. 12A). Les domaines N-terminal et la séquence d'acides aminés entre TM3 et TM4 forment deux larges boucles extracellulaires (S1 et S2) qui s'associent pour former la poche hydrophile qui constitue le site de liaison du L-glutamate (Stern-Bach et al., 1994). Récemment, ce site de liaison a pu être exprimé séparément et cristallisé seul ou lié à des agonistes pour les trois types de récepteurs ionotropiques glutamatergiques (Armstrong et al., 1998; Mayer, 2005a; Furukawa and Gouaux, 2003). L'analyse aux rayons X des cristaux révèle que ce site S1S2 a

une forme de « coquillage » et que l'agoniste se fixe entre les deux coquilles (Armstrong et al., 1998; Fig. 12A). Ces travaux ont également permis de déterminer les acides aminés essentiels à la fixation d'agonistes spécifiques (pour revue voir Madden, 2002; Gouaux, 2004; Mayer, 2005b).

#### II.2.1.1.3. Activation et ouverture du canal

Comme tous les récepteurs ionotropiques, les iGluRs sont des protéines allostériques en équilibre entre différentes conformations (selon le modèle classique Monod-Wyman-Changeux MWC ; Monod et al., 1965). Initialement, les récepteurs sont inactifs. Selon le modèle MWC, la fixation de deux molécules de glutamate favorise le passage du récepteur de la conformation inactive à la conformation active. Le récepteur peut ensuite soit adopter la conformation ouverte, soit entrer dans une conformation fermée en présence de l'agoniste on parle d'état désensibilisé (Mayer, 2005b; Gouaux, 2004; Madden, 2002; Fig. 13). Les récepteurs ouverts vont, au bout d'un certain temps, se refermer soit parce que le glutamate se dissocie de son site de liaison (déactivation) soit parce que le récepteur-canal se ferme même en présence de glutamate (désensibilisation). Des équilibres existent entre ces différentes conformations avec des constantes de temps associées. Ces constantes de temps diffèrent en fonction de la composition en sous-unités des récepteurs, de la forme de ces sous-unités (éditées ou non-éditée voir plus bas), de la nature de l'agoniste ou de la fixation de modulateurs allostériques. Ainsi, certains récepteurs ont des cinétiques de désensibilisation rapide tandis que d'autres ont des cinétiques de désensibilisation plus lente. Pour les récepteurs ayant des cinétiques de désensibilisation rapide comme les récepteurs AMPA et kainate (quelques ms voir Kiskin et al., 1986; Mayer and Vyklicky, Jr., 1989) celle-ci détermine la limite du temps de décroissance temporelle d'un courant synaptique. L'analyse aux rayons X de formes cristallines des domaines S1S2 de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA en liaison avec des agonistes complets, des agonistes partiels ou des antagonistes ont permis récemment faire de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes de couplage entre la fixation du ligand et l'ouverture du canal. Le degré d'ouverture du « coquillage » S1S2 (l'angle formé entre les deux « coquilles ») est un élément important pour déterminer l'ouverture ou la fermeture du canal (Armstrong et al., 1998). Cette ouverture est maximale au repos et en présence d'un antagoniste, minimale en présence d'un agoniste sélectif (glutamate) et intermédiaire en présence d'un agoniste partiel



**Figure 13. Modèle d'activation et d'inactivation des récepteurs ionotropiques**

Au repos le complexe S1S2 est ouvert. La fixation du ligand crée une tension au niveau du site de dimérisation S1S2 et de la partie hydrophobe (verte) formant le pore du canal. En fonction des forces relatives le canal va soit s'ouvrir soit se désensibiliser.

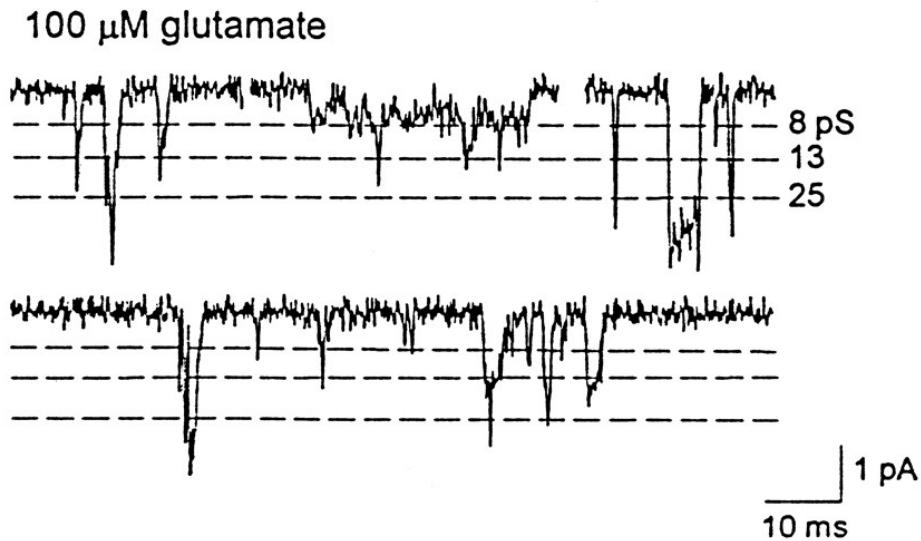


(Mayer, 2005a; Furukawa and Gouaux, 2003; Armstrong and Gouaux, 2000 ; Fig. 12 B et C). De plus, les complexes S1S2 de deux sous-unités s'assemblent en dimères (Sun et al., 2002; Fig. 12D). La fermeture des deux « coquillages » couplerait mécaniquement la fixation de deux molécules de glutamate à l'ouverture du canal (Fig. 13).

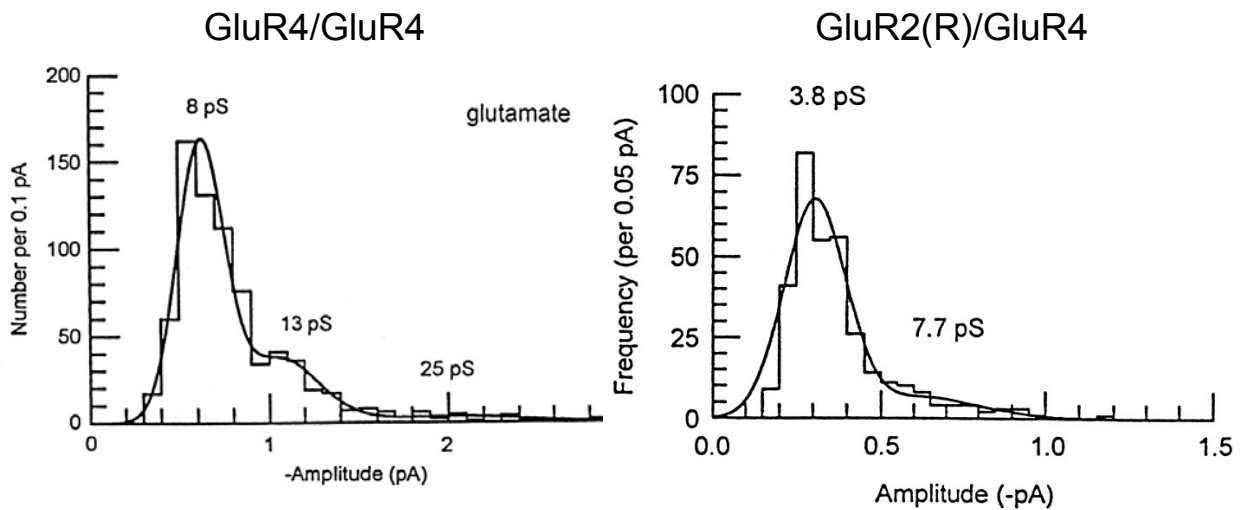
#### II.2.1.1.4. Désensibilisation

Des travaux récents montrent que la stabilité du dimère entre sous-unités intervient directement dans la désensibilisation (Sun et al., 2002). Lorsque ce dimère est stabilisé par des mutations ou par la cyclothiazide (qui se fixe à ce niveau pour les récepteurs AMPA voir Fig. 13), la désensibilisation des récepteurs est réduite. Donc plus ce dimère est stable et moins le récepteur se désensibilise facilement en présence de l'agoniste. En fait le couplage entre la fixation du glutamate et l'ouverture du canal ne peut se faire que si le dimère est stable. Lorsque le glutamate se fixe et que le « coquillage » se referme sur lui, une tension se crée à la fois au niveau du domaine transmembranaire qui forme le pore et au niveau de la zone de contact entre les deux « coquillages ». Ensuite en fonction de la force relative de ces contraintes soit le récepteur s'ouvre, soit le domaine de connexion entre les « coquillages » se réarrange et le récepteur se désensibilise (Jin et al., 2003 voir Fig. 13). Si la connexion entre les « coquillages » est très stable (comme c'est le cas en présence de cyclothiazide) la tension qui se crée à ce niveau n'entraîne pas de changement de conformation et le canal s'ouvre sans se désensibiliser. Si la connexion entre les « coquillages » est plus instable, la fermeture des coquillages après fixation de l'agoniste entraîne directement un changement de conformation aboutissant à la conformation désensibilisée sans que le canal se soit ouvert. Donc la fermeture du coquillage est couplée soit à l'ouverture du récepteur soit à sa désensibilisation sans ouverture en fonction de la stabilité du dimère S1S2. Comme on l'a vu, la fixation d'agonistes partiels entraîne une fermeture des coquillages moins importante. La fixation des agonistes partiels est donc à la fois couplée à une ouverture des canaux moins importante mais également une désensibilisation incomplète. Ainsi, le kainate, un agoniste partiel des récepteurs AMPA à forte concentration génère à leur niveau un courant qui se désensibilise moins que le courant généré par les agonistes complets que sont le glutamate et l'AMPA (Patneau and Mayer, 1991; Zorumski and Yang, 1988).

A



B



**Figure 14. Conductances unitaires des récepteurs AMPA et expression de la sous-unité GluR2(R)**

A. Ouverture d'un canal unitaire suite à l'application de glutamate.  
B. Histogramme de répartition des amplitudes pour un récepteurs homomériques GluR4 (gauche) et pour un récepteur hétéromérique GluR2(R)/GluR4 (droite).

D'après Swanson., 1997

## II.2.1.2. Les récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA sont considérés comme étant les principaux médiateurs de la transmission synaptique excitatrice dans le système nerveux central.

### II.2.1.2.1. Composition en sous-unités, conductances unitaires et désactivation

Le clonage du premier ADNc qui, lorsqu'il est exprimé dans des ovocytes de xénopes, produit un récepteur au glutamate fonctionnel date de 1989 (Hollmann et al., 1989). Cette première protéine a été nommée GluR-K1. Peu de temps après, d'autres groupes clonèrent les quatre gènes codant pour les sous-unités des récepteurs AMPA : GluR1-4 ou GluR A-D (Boulter et al., 1990; Keinanen et al., 1990; Nakanishi et al., 1990). L'expression de ces sous-unités dans des ovocytes de xénope a montré que des sous-unités identiques pouvaient s'assembler pour former un *récepteur homomérique* fonctionnels. Des sous-unités différentes peuvent aussi s'assembler entre elles pour former des *récepteurs hétéromériques*. Ces récepteurs ont des propriétés physiologiques différentes en fonction des sous-unités qui entrent dans leur composition. Ainsi, les récepteurs AMPA homomériques formés de la sous-unité GluR2 ont une conductance unitaire très faible en comparaison des récepteurs formés des sous-unités GluR1 ou GluR3 (Nakanishi et al., 1990; Verdoorn et al., 1991). Par contre lorsque la sous-unité GluR2 est exprimée avec la sous-unité GluR1 ou GluR3 pour former des récepteurs hétéromériques, ceux-ci ont une conductance unitaire comparable aux récepteurs homomériques formés des sous unités GluR1 ou GluR3. Ainsi, au niveau d'un même neurone, certaines synapses glutamatergiques peuvent être spécifiquement enrichies en récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluR2 (Toth and McBain, 1998).

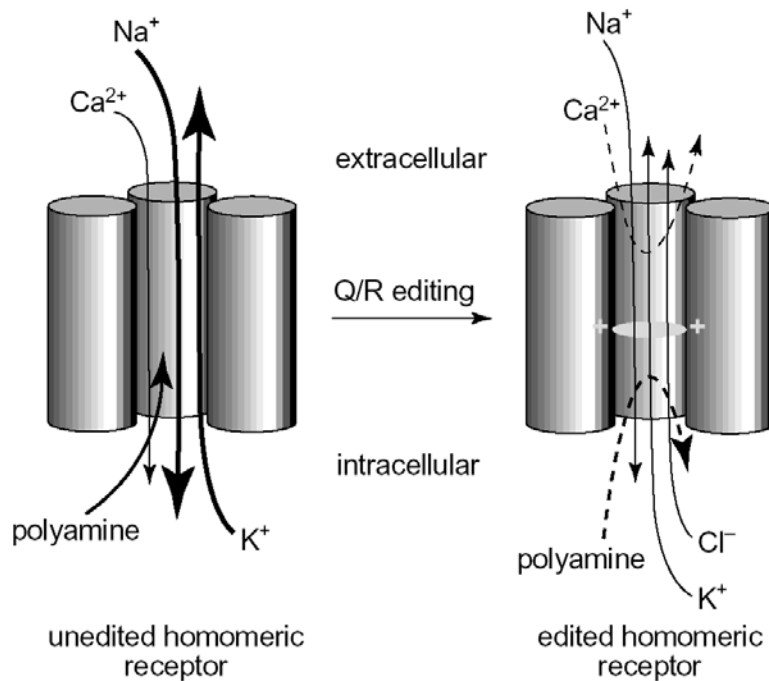
Les valeurs de conductances élémentaires des récepteurs AMPA ont été déterminées à partir de neurones en culture ou sur tranche pour lesquels la composition en sous unités était inconnue. Le courant passant par un seul récepteur AMPA peut être enregistré en *patch-clamp* en configuration *outside-out*. En présence de 30  $\mu$ M de glutamate dans le milieu extracellulaire, on observe des courants de différentes amplitudes. La réalisation d'histogramme permet de mettre en évidence différents niveaux de conductance correspondant à l'ouverture du canal. On distingue en général une conductance principale et des niveaux de conductance plus élevés qui apparaissent moins fréquemment (Swanson et al., 1997b; Fig. 14). Des récepteurs formés de différentes sous-unités peuvent avoir différentes conductances principales (généralement entre 6 et 20 pS). Ces différentes conductances

correspondent à différentes conformations (ouverte ou fermée) de chaque sous-unité. Une seule sous-unité dans la configuration ouverte ne laisse passer aucun courant ou un courant non visible lors d'enregistrement de canaux unitaires. Deux sous-unités dans la configuration ouverte entraînent la conductance minimale enregistrée et les deux autres niveaux de conductance correspondent respectivement à 3 et 4 sous unités dans la configuration ouverte (Rosenmund et al., 1998; Jin et al., 2003; Robert et al., 2001). Les enregistrements de canaux unitaires permettent aussi de déterminer la durée moyenne d'ouverture des canaux isolés. Pour les récepteurs AMPA étudiés cette durée moyenne est de l'ordre de 0.5 à 1.5 ms. Des systèmes d'application rapide de glutamate permettent également de mesurer la constante de désactivation (fermeture du canal par déliaison de l'agoniste) des récepteurs AMPA qui est de l'ordre de 0.5 à 3 ms en fonction des sous-unités entrant dans leur composition et par conséquent en fonction des cellules étudiées. Ainsi la constante de désactivation des récepteurs AMPA des cellules en grain du cervelet est de l'ordre de 0.5 ms tandis que la constante de désactivation des récepteurs AMPA prélevés au niveau des cellules de l'hippocampe est de l'ordre de 2.5 ms.

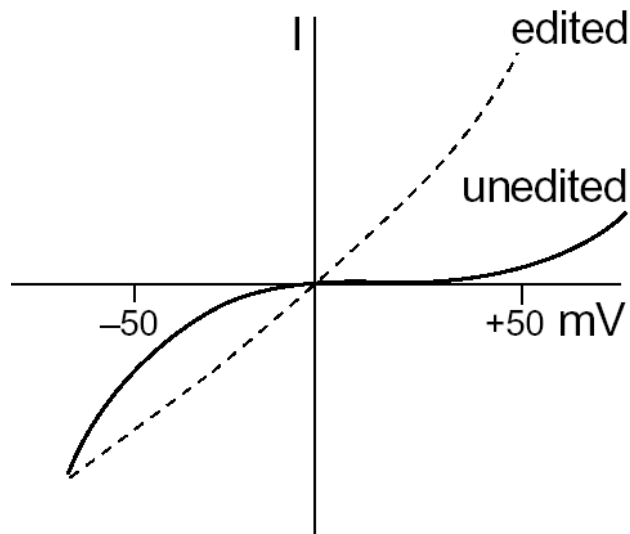
#### II.2.1.2.2. Édition de la sous-unité GluR2 et perméabilité au calcium

La composition en sous-unité influence également la perméabilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  des récepteurs AMPA. Ainsi, les récepteurs homomériques formés des sous-unités GluR1 et GluR3 et les récepteurs hétéromériques formés de ces deux sous-unités ont une bonne perméabilité au calcium alors que les récepteurs hétéromériques contenant la sous-unité GluR2 associée à GluR1 ou GluR3 ont une faible perméabilité au calcium. Une étude élégante a permis de montrer que cette particularité était due à un phénomène d'édition de l'ARNm codant pour la sous-unité GluR2 (Burnashev et al., 1992). Cette édition entraîne le changement d'un seul acide aminé au niveau du second segment pseudo-transmembranaire TM2 de la sous-unité GluR2 qui comme nous l'avons vu participe à la formation du pore. Ainsi, alors que l'ADN codant pour cette région de la sous-unité GluR2 présente un codon glutamine (CAG) comme l'ADN codant pour la même région des autres sous-unités, l'ARNm correspondant présente, pour la sous-unité GluR2 un codon arginine (CGG), alors qu'un codon glutamine est présent au niveau des ARNm codant pour les autres sous-unités. Lorsqu'on remplace l'arginine de la sous-unité GluR2 par une glutamine, les récepteurs hétéromériques contenant la sous-unité GluR2 sont de nouveau perméables au calcium (Burnashev et al., 1992). Chez l'adulte, 99.9 % des sous-unités GluR2 sont éditées aussi

A



B



**Figure 15. Effet de l'édition des sous-unités des récepteurs AMPA sur la rectification de la courbe I/V**

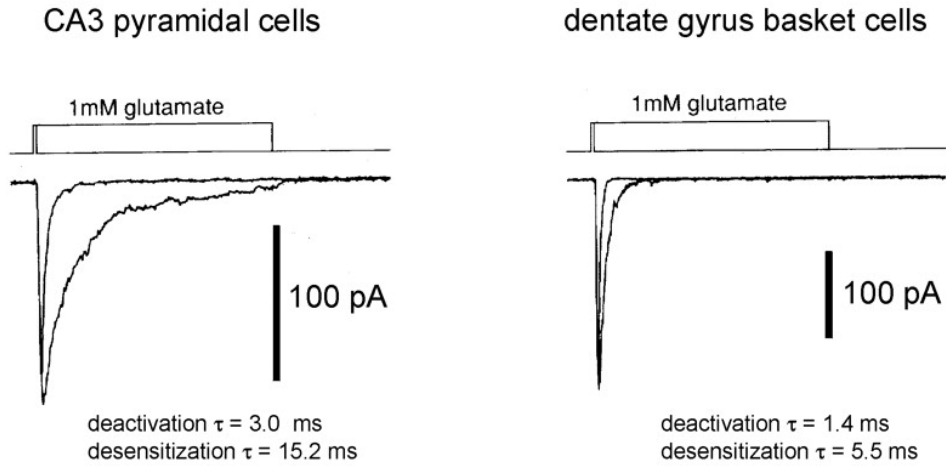
Lorsque le récepteurs AMPA ne contient pas la sous-unité GluR2 ou contient une forme non éditée de cette sous-unité (A gauche), il est perméable au calcium et peut être bloqué par les polyamines ce qui entraîne une rectification de la courbe I/V (B ligne pleine). Lorsqu'il contient la forme éditée de la sous-unité GluR2 (A droite) un anneau de charges positives empêche le passage des cations divalents et diminue le passage des cations monovalents. Le récepteur ne peut plus être bloqué par les polyamines et la courbe I/V est linéaire (B ligne pointillée).

considère-t-on que des récepteurs AMPA contenant la sous-unité GluR2 sont imperméables au calcium tandis que ceux ne contenant pas la sous-unité GluR2 sont perméables au calcium. On peut facilement tester l'édition des sous unités au niveau synaptique en exprimant le courant passant par un ensemble de récepteurs AMPA en fonction du voltage (courbe I/V). Lorsque les sous-unités sont non-éditées, la courbe I/V présente une double rectification due au blocage du canal par des polyamines chargées positivement à pH physiologique notamment la spermine. Lorsqu'une sous-unité est uniquement formée de sous-unité éditées, celles-ci forment un anneau de charges positives au niveau du pore et les polyamines ne peuvent plus venir bloquer le pore du canal. Dans ce cas la courbe I/V ne présente plus de rectification (Fig. 15). La présence de la sous-unité GluR2 est variable selon les neurones. Dans l'hippocampe, les interneurones en panier expriment peu la sous unité GluR2 contrairement aux cellules pyramidales de la région CA3 et aux cellules du gyrus denté (Geiger et al., 1995).

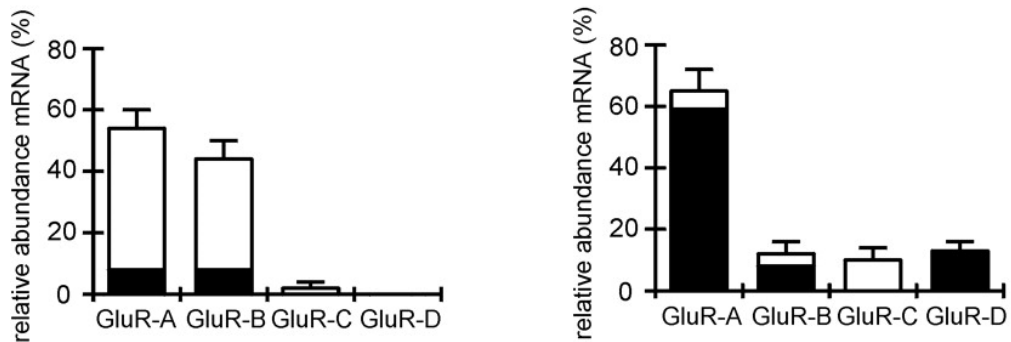
#### II.2.1.2.3 Epissage alternatif et désensibilisation

L'étude des ARNm codant pour les sous-unités des récepteurs AMPA montre que chacun peut exister sous deux formes appelées flip et flop. Ces formes varient au niveau d'une séquence codant pour 38 acides aminés présents un peu avant le quatrième segment transmembranaire et appelée module flop. Ce module est présent dans la partie S2 du récepteur et intervient dans la dimérisation des complexes S1S2 entre sous-unités. Dans la configuration flip, deux ponts hydrogènes supplémentaires stabilisent le dimère. Il n'est donc pas surprenant qu'en fonction de la forme flip ou flop de leurs sous-unités les récepteurs AMPA peuvent avoir des propriétés fonctionnelles différentes en terme de désensibilisation. Ainsi, les récepteurs contenant des sous-unités sous leur forme flop se désensibilisent plus facilement lors d'application de glutamate exogène et le courant dépolarisant résultant a une durée plus brève. Au contraire les récepteurs incluant des sous unités sous leur forme flip se désensibilisent assez peu et sont peu sensibles à l'action de la cyclothiazide. Les sous-unités des récepteurs AMPA sous leurs formes flip et flop sont largement exprimés dans la plupart des cellules du système nerveux des mammifères. On distingue néanmoins des variations intercellulaires. Des travaux utilisant l'analyse des ARNm exprimés par une cellule par RT-PCR après enregistrement permettent de corrélérer l'expression de différentes sous-unités des récepteurs NMDA dans des cellules individuelles avec la cinétique de désensibilisation des récepteurs AMPA présents dans ces cellules (Lambolez et al., 1992). Ces travaux montrent des

A



B



**Figure 16. Influence de l'édition du module flop sur la cinétique des courants glutamatergiques**

A. Réponse des cellules pyramidales de CA3 (gauche) et des cellules en panier du gyrus denté (droite) à des applications brève (déactivation) ou prolongées (désensibilisation) de glutamate.

B. Pourcentage des sous-unités des récepteurs AMPA sous forme flip (blanc) ou flop (noir). Noter que les cinétiques de désensibilisation lentes sont corrélées à la présence de sous-unités sous leurs formes flip.

variations d'expression dans les cellules corticales notamment entre les cellules pyramidales et les interneurons. Des différences similaires ont été enregistrées dans l'hippocampe. Ainsi, les récepteurs AMPA exprimés par les cellules en panier inhibitrices du gyrus denté sont principalement sous la forme flop tandis que ceux exprimés par les cellules pyramidales de la région CA3 et les cellules moussues du hilus sont principalement sous la forme flip (Geiger et al., 1995; Jonas, 2000 ; voir Fig. 16). Ces différences pourraient expliquer les cinétiques de désensibilisation plus rapides observées pour les récepteurs AMPA exprimés par les interneurons (4.5ms) que par les pyramides (15ms ; Jonas, 2000; Jonas et al., 2004).

#### II.2.1.4. Les récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA jouent un rôle particulier dans les phénomènes de plasticité de la transmission synaptique que l'on observe pendant le développement, l'apprentissage et la mémorisation. L'activation de ce récepteur est également associée aux phénomènes de mort neuronale observée après des lésions du système nerveux. Ces fonctions particulières sont liées à deux propriétés qui le distinguent des autres récepteurs ionotropiques au glutamate. La première est l'associativité : pour que la fixation du glutamate permette le passage d'ion au niveau du récepteur NMDA, il faut que la membrane post-synaptique soit suffisamment dépolarisée. Cette propriété est due au fait qu'au potentiel de repos, le pore du canal est bloqué par un ion magnésium empêchant le passage des anions même après ouverture du canal par fixation du glutamate (Ascher and Nowak, 1988). La seconde propriété du récepteur NMDA est sa grande perméabilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainsi, l'ouverture des récepteurs NMDA en plus de modifier le potentiel du neurone post-synaptique va aussi modifier l'activité enzymatique de nombreuses protéines susceptibles de modifier durablement son fonctionnement et sa morphologie. L'augmentation excessive de calcium suite à une activation prolongée des récepteurs NMDA est aussi responsable de phénomènes de mort neuronale par apoptose.

##### II.2.1.3.1. Composition en sous-unités et conductances unitaires

Le premier gène codant pour une sous-unité des récepteurs NMDA a été cloné au début des années 1990. La première sous-unité, NMDAR-1 (NR1) peut former des récepteurs homomériques lorsqu'elle est exprimée seule dans des ovocytes de xénope mais la conductance unitaire de ces canaux est très faible (Moriyoshi et al., 1991). Quatre autres



gènes codant pour les sous-unités NMDAR2A (NR2A), NMDAR2B (NR2B), NMDAR2C (NR2C) ont ensuite été identifiées. Ces sous-unités ne peuvent former des récepteurs homomériques, mais forment des récepteurs hétéromériques lorsqu'elles sont co-exprimées avec la sous-unité NR1 dans les systèmes hétérologues. Ces récepteurs hétéromériques ont une conductance unitaire 10 à 60 fois plus grande que les récepteurs homomériques NR1. De plus, contrairement à NR1 qui est exprimé dans la plupart des cellules du système nerveux central, les sous-unités NR2A-D ont des expressions plus spécifiques. Par exemple seules les sous-unités NR2A et NR2B sont exprimées dans l'hippocampe et le cortex (Nakanishi, 1992).

Du fait de sa sensibilité aux concentrations extracellulaires en ions  $Mg^{2+}$ , les conductances unitaires des récepteurs NMDA ont principalement été étudiées en l'absence de ces ions dans le milieu extracellulaire. L'étude des courants unitaires passant par des canaux formés des sous-unités NR1/NR2A ou NR1/NR2B enregistrés en configuration outside-out permet de déterminer deux niveaux principaux de conductances avec une conductance principale plus importante que pour les récepteurs AMPA de l'ordre de 50 pS. La durée moyenne d'ouverture de ces canaux est également plus grande entre 2.5 et 5 ms pour la conductance principale et entre 0.1 à 6 ms pour la conductance secondaire de l'ordre de 40 pS. Comme pour les récepteurs AMPA, la composition en sous-unité des récepteurs NMDA détermine leurs propriétés unitaires. Ainsi, les récepteurs formés des sous-unités NR1/NR2C et NR1/NR2D sont caractérisés par des conductances unitaires plus faibles (35 pS pour la conductance principale et 19 pS pour la conductance secondaire) (Stern et al., 1992). Les récepteurs NMDA de forte conductance se caractérisent également par des ouvertures en bouffées entrecoupées par de longues périodes (plusieurs dizaines de millisecondes) pendant lesquelles le canal est fermé en présence du ligand sans être désensibilisé (Gibb and Colquhoun, 1991). Ce comportement particulier qui n'est pas observé pour d'autres récepteurs ionotropiques ( $GABA_A$ , nicotiques, AMPA) pourrait expliquer pourquoi les courants synaptiques portés par les récepteurs NMDA durent beaucoup plus longtemps que la durée du pic de concentration en glutamate dans la fente synaptique. Comme pour les récepteurs AMPA, des récepteurs NMDA contenant des sous-unités particulières sont spécifiquement exprimés au niveau de certaines afférences synaptiques où ils sont responsables de formes particulières de plasticité synaptique (Lei and McBain, 2002; Bischofberger and Jonas, 2002).

#### II.2.1.3.2. Perméabilité des récepteurs NMDA et sensibilité aux ions $Mg^{2+}$

Comme les récepteurs AMPA, les récepteurs NMDA sont perméables aux cations monovalents et leur potentiel d'inversion se situe autour de 0 mV. Mais comme nous l'avons vu, cette perméabilité dépend du voltage. Lorsque la concentration extracellulaire en ions  $Mg^{2+}$  est physiologique, le passage des cations est réduit à des potentiels négatifs alors qu'il n'est pas modifié pour des potentiels plus positifs. Ainsi, la courbe I/V n'est pas linéaire entre -80 mV et 0 mV. Cette sensibilité varie en fonction des sous-unités qui forment le récepteur : les récepteurs formés des sous-unités NR1/NR2A et NR1/NR2B sont sensibles à des concentrations extracellulaires en  $Mg^{2+}$  de 0.1 mM alors que les récepteurs formés des sous-unités NR1/NR2C ne sont sensibles qu'à des concentrations extracellulaires de l'ordre de 0.5 mM. Comme les concentrations physiologiques sont de l'ordre de 1 mM, la plupart des récepteurs NMDA sont bloqués à des potentiels proches du potentiel de repos. L'analyse des séquences en acides aminés montre la présence d'une asparagine au niveau d'un site équivalent au site Q/R de la sous-unité GluR2 pour les sous-unités NR1 et NR2A-D. Des expériences de mutagenèse dirigée montrent que cette asparagine au niveau de la sous-unité NR1 serait importante pour la perméabilité calcique des récepteurs NMDA. La présence de cette asparagine au niveau des sous-unités NR2A-D interviendrait principalement dans le blocage voltage dépendant par les ions  $Mg^{2+}$ . L'autre particularité des récepteurs NMDA est leur perméabilité calcique. Celle-ci a pu être mesurée en utilisant des colorants fluorescents dont la fluorescence dépend directement de la concentration intracellulaire en calcium comme le FURA-2. Ces mesures ont permis d'évaluer la proportion de courant porté par les ions  $Ca^{2+}$  lors d'un événement NMDA. Cette proportion est de l'ordre de 11 % pour les récepteurs NR1/NR2A et de 8% pour les récepteurs NR1/NR2C. A titre de comparaison, la proportion de courant porté par les ions  $Ca^{2+}$  pour les récepteurs AMPA perméables au calcium est de 3.5% et de 0.5% pour les récepteurs AMPA non perméables au calcium.

#### II.2.2. Les récepteurs métabotropiques

Le glutamate et ses récepteurs *ionotropiques* ont classiquement été associés à la transmission synaptique rapide. Mais la découverte de récepteurs *métabotropiques* au glutamate dans les années 1980, dont l'activation ne résultait pas directement dans l'ouverture de canaux mais pouvait modifier l'activité enzymatique de certaines phospholipases, a fait évoluer cette vision (Sladeczek et al., 1985). On admet aujourd'hui que le glutamate peut

avoir des effets neuromodulateurs plus lents au niveau neuronal au même titre que d'autres neuromodulateurs classiques.

#### II.2.2.1 Structure des récepteurs métabotropiques

Huit gènes codent pour les récepteurs métabotropiques au glutamate : mGluR1-8. Ces récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs transmembranaires associés aux protéines G. Comme tous les récepteurs de cette superfamille ils sont formés d'une seule protéine ayant sept domaines transmembranaires. La longue partie N-terminale extracellulaire fixe le glutamate tandis que la partie C terminale intracellulaire interagit avec les protéines G. Certains gènes peuvent générer différents récepteurs par épissage alternatif (par exemple le gène codant pour mGluR1 donne les protéines mGluR1 $\alpha$ , mGluR1 $\beta$ , mGluR1c et mGluR1d). Les protéines sont regroupées en 3 grandes familles en fonction d'homologies de séquences, de caractéristiques pharmacologiques et de couplage avec des seconds messagers : les récepteurs du groupe I (mGluR1 et mGluR5), groupe II (mGluR2 et mGluR3) et groupe III (mGluR4a, mGluR7a, mGluR7b, mGluR8) (pour revue voir Nakanishi, 1992; Pin and Duvoisin, 1995).

#### II.2.2.2 Localisation des récepteurs mGluRs post-synaptiques dans l'hippocampe

Dans l'hippocampe, les récepteurs du groupe I sont localisés essentiellement au niveau post-synaptique (Lujan et al., 1996; Shigemoto et al., 1992) tandis que les récepteurs des groupes II et III sont localisés au niveau pré-synaptique (Shigemoto et al., 1997). Les récepteurs du groupe I ont différentes localisations cellulaires et subcellulaires en fonction du gène codant pour le récepteur et l'épissage de ce gène. Des anticorps reconnaissant tous les isoformes de mGluR1 montrent un marquage au niveau des cellules pyramidales de la région CA3 et des cellules granulaires du gyrus denté, tandis que des anticorps contre mGluR5 marquent sélectivement les dendrites des cellules pyramidales de la région CA1 (Lujan et al., 1996; Shigemoto et al., 1992; Schoepp and Conn, 1993). Des anticorps plus spécifiques montrent que mGluR1 $\alpha$  est principalement exprimé dans les interneurons des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe tandis que mGluR1 $\beta$  est fortement exprimé au niveau du corps cellulaire et des dendrites des cellules principales de la région CA3 de l'hippocampe et du gyrus denté (Ferraguti et al., 1998). Au niveau des interneurons de la région CA1, les

récepteurs mGluR1 $\alpha$  sont principalement exprimés par les O-LM, des interneurons spécifiques d'autres interneurons (IS1, 2 et 3), une partie des interneurons bi-stratifiés et un sous-type d'interneurone CCK+ qui correspondraient aux interneurons associés aux collatérales de Schaffer (Ferraguti et al., 2004) voir chapitre I pour une description plus détaillée de ces interneurons).

### II.2.2.3. Rôle physiologique des récepteurs mGluRs post-synaptiques

#### II.2.2.3.1. Activation synaptique et genèse de courants synaptiques lents dans les cellules principales

L'application exogène *in vitro* d'agonistes des mGluR du groupe I induit une dépolarisation lente et une augmentation de la fréquence de décharge au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 (Charpak et al., 1990; Crepel et al., 1994) et CA3 (Guerineau et al., 1994) ainsi qu'au niveau des interneurons (Miles and Poncer, 1993; Mcbain et al., 1994; van Hooft et al., 2000). Ces effets sont dus à l'activation de conductances cationiques non-spécifiques sensibles ou non au calcium (Crepel et al., 1994; Guerineau et al., 1995) et à une action inhibitrice directe de ces récepteurs sur les conductances potassiques ouvertes au potentiels de repos ( $I_{K,leak}$ ; Guerineau et al., 1994), sur les canaux potassiques voltage-dépendants ( $I_M$ ; Charpak et al., 1990), sur les canaux potassiques voltage-dépendants ( $I_{AHP}$ ). Les récepteurs mGluRs sont localisés au niveau péri-synaptique et des courants synaptiques ayant des cinétiques lentes ont été décrits après stimulation forte et/ou à haute fréquence des fibres afférentes au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 (Congar et al., 1997) et des cellules pyramidales de la région CA3 (Miller et al., 1995) de l'hippocampe. Ce courant est bloqué par des antagonistes des récepteurs mGluRI, dépend de l'activation des protéines G et de l'activation courants cationiques non sélectifs sensibles au calcium (CAN) (Congar et al., 1997). Enfin les récepteurs métabotropiques participent à la potentialisation des récepteurs NMDA (Aniksztejn et al., 1991; Aniksztejn et al., 1992; Fitzjohn et al., 1996). Les mGluRs du groupe I sont couplés positivement à la phospholipase C, leur activation entraîne la formation de seconds messagers : l'inositol-triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). L'IP3 peut entraîner la libération de calcium par le reticulum endoplasmique lisse (Fagni et al., 2000; Sugiyama et al., 1987; Takechi et al., 1998). Le DAG active la protéine kinase C qui peut moduler par phosphorylation l'activité de nombreux canaux voltage dépendants mais aussi le fonctionnement de nombreux récepteurs ionotropiques (Ben Ari et al., 1992).

#### II.2.2.3.2. Modulation de la libération de glutamate par les mGluRs

Les récepteurs du groupe II (mGluR2 et mGluR3) et III (mGluR4a, mGluR7a, mGluR7b, mGluR8) sont spécifiquement exprimés au niveau pré-synaptiques (Shigemoto et al., 1997). Ces récepteurs sont couplés négativement à l'adénylate cyclase et leur activation par le glutamate entraîne une diminution de la concentration en AMPc (Tanabe et al., 1993). Dans l'hippocampe, différents récepteurs sont exprimés au niveau de terminaisons spécifiques : les récepteurs mGluR2 et mGluR7a sont exprimés au niveau de la voie enthorinale médiane tandis que mGluR8 est principalement exprimé au niveau de la voie enthorinale latérale dans la région CA3 et dans le gyrus denté (Shigemoto et al., 1997). Dans la région CA3, les fibres moussues expriment les récepteurs mGluR2, mGluR7a et mGluR7b tandis que les fibres associatives/commissurales expriment uniquement mGluR7a. L'activation de ces récepteurs par des agonistes spécifiques réduit la transmission synaptique glutamatergique : au niveau du gyrus denté, l'application d'un agoniste spécifique des mGluRs du groupe II (mGluR2 et mGluR3), le DCGIV, réduit la transmission synaptique au niveau de la voie perforante médiane (Macek et al., 1996) tandis que l'application d'un agoniste spécifique des mGluRs du groupe III (mGluR4, mGluR6 et mGluR8), le L-AP4 réduit la transmission synaptique au niveau de la voie perforante latérale (Macek et al., 1996; Koerner and Cotman, 1981). Au niveau de la région CA3, l'application de DCGIV réduit la transmission synaptique au niveau de la voie des fibres moussues (Yoshino et al., 1996; Kamiya et al., 1996) mais pas des fibres associatives/commissurales. Le DCGIV est donc souvent utilisé en électrophysiologie pour distinguer les événements dus à l'activation des fibres moussues. Les récepteurs mGluRs sont également présents spécifiquement au niveau de synapses glutamatergiques qui contactent des interneurons (Freund and Buzsaki, 1996; Somogyi and Klausberger, 2005). Il est intéressant de constater que le DCGIV diminue la transmission synaptique excitatrice au niveau des fibres moussues qui contactent les interneurons du stratum lucidum, mais pas au niveau des récurrentes collatérales qui contactent ces même interneurons (Toth and McBain, 1998; Toth et al., 2000). Dans des conditions physiologiques ces récepteurs sont principalement activés lors de stimulation à haute fréquence (notamment les récepteurs mGluR du groupe II qui sont plus éloignés des zones actives que les récepteurs du groupe III) et permettraient de limiter une trop forte libération de glutamate et ses conséquences pathologiques (Scanziani et al., 1997). En effet,

des souris ayant un gène codant pour les récepteurs mGluR7 muté sont plus susceptibles de faire des crises d'épilepsie (Sansig et al., 2001).

La libération de glutamate est contrôlée par de nombreux autres récepteurs de types métabotropiques dont les récepteurs GABAB et les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine. Cette libération est également contrôlée par des récepteurs ionotropiques notamment les récepteurs KA (voir Chapitre III). Les récepteurs au mGluR contrôlent également la libération de nombreux autres neurotransmetteurs (pour revue voir (Cartmell and Schoepp, 2000)).

## Chapitre III: Les récepteurs kainate

Le kaïnate (KA) ou « fantôme de la mer » en Japonais a été isolé pour la première fois en 1953 à partir de l'algue *Digenea Simplex* (BenAri, 1985). L'effet excitateur de cette substance sur les neurones est révélé dans les années 1970 (Shinozaki and Konishi, 1970; Watkins et Evans, 1981; Davies et al., 1979). Cet effet est utilisé pour léser sélectivement des neurones par excès d'excitation (excitotoxicité; Olney, 1969; Olney et al., 1974) sans léser les fibres de passage (Coyle et al., 1978; Coyle, 1983). En 1979, Ben-Ari et ses collègues montrent que l'injection de KA dans l'amygdale induit des crises d'épilepsie (Ben Ari et al., 1979). Cette découverte permet de mettre au point les premiers modèles animaux d'épilepsie chronique (BenAri, 1985; Cavalheiro et al., 1982; Tremblay and Ben Ari, 1984). Parallèlement, l'utilisation de KA radiomarké ([<sup>3</sup>H]KA) permet de mettre en évidence des sites à haute affinité dans le système nerveux et suggère que l'action cérébrale du KA peut être due à sa fixation par des récepteurs spécifiques (Simon et al., 1976; London and Coyle, 1979; Monaghan et Cotman, 1982). En 1986, Agrawal et ses collègues renforcent l'hypothèse de récepteurs spécifiques en démontrant que le KA mais pas l'AMPA ou le NMDA dépolarisent les nerfs de la racine dorsale de la moëlle (Agrawal and Evans, 1986). Les études suivantes montrèrent que le KA appliqué au niveau des neurones des ganglions de la racine dorsale de la moëlle induit des courants qui se désensibilisent rapidement et qui diffèrent des courants non désensibilisés classiquement observés après application de KA et dus à l'action du KA sur les récepteurs AMPA (Huettnner, 1990). Entre 1990 et 1992, les sous-unités formant les récepteurs KA (RKA) sont clonées (Bettler et al., 1990; Bettler et al., 1992; Egebjerg et al., 1991; Herb et al., 1992; Werner et al., 1991). L'expression de ces sous-unités dans des systèmes hétérologues permet de déterminer les propriétés fonctionnelles de ces récepteurs (Egebjerg et al., 1991; Schiffer et al., 1997; Sommer et al., 1992). Parallèlement, la mise au point de sondes reconnaissant spécifiquement les ARNm codant pour les récepteurs KA permet de déterminer quelles cellules les expriment dans le système nerveux adulte et en développement (Bettler et al., 1990; Herb et al., 1992; Schiffer et al., 1997; Bahn et al., 1994; Wisden and Seeburg, 1993a) }. La mise au point d'anticorps contre les sous-unités des récepteurs KA permet également de déterminer leur localisation (Petrulia et al., 1994). Ces études ont confirmé et étendu les données obtenues par autoradiographie.

Ainsi, la connaissance des propriétés pharmacologiques, structurales et unitaires des RKA a progressé rapidement dans les 30 dernières années. Par contre, l'étude des propriétés des récepteurs natifs s'est avérée plus difficile faute d'antagonistes sélectifs permettant de bloquer sélectivement les récepteurs AMPA ou KA. Les récepteurs KA ont donc longtemps



été regroupés fonctionnellement avec les récepteurs AMPA sous le titre de récepteurs ionotropiques non-NMDA ou récepteurs AMPA/KA (pour revue voir Lerma et al., 2001). L'avènement d'antagonistes sélectifs des récepteurs AMPA ainsi que d'animaux présentant des mutations au niveau des gènes codant pour les sous-unités des récepteurs KA ont récemment offert deux approches complémentaires pour disséquer ces fonctions. Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent directement dans ce courant de recherche. Dans ce chapitre nous allons décrire les progrès rapides qui ont été réalisés dans la connaissance des récepteurs KA exprimés dans les systèmes hétérologues puis nous allons décrire les outils pharmacologiques qui ont permis de la caractérisation fonctionnelle des récepteurs KA natifs. Enfin, nous allons décrire les données que nous avons au moment où a débuté ce travail de thèse concernant le rôle des récepteurs KA pré- et post-synaptiques.

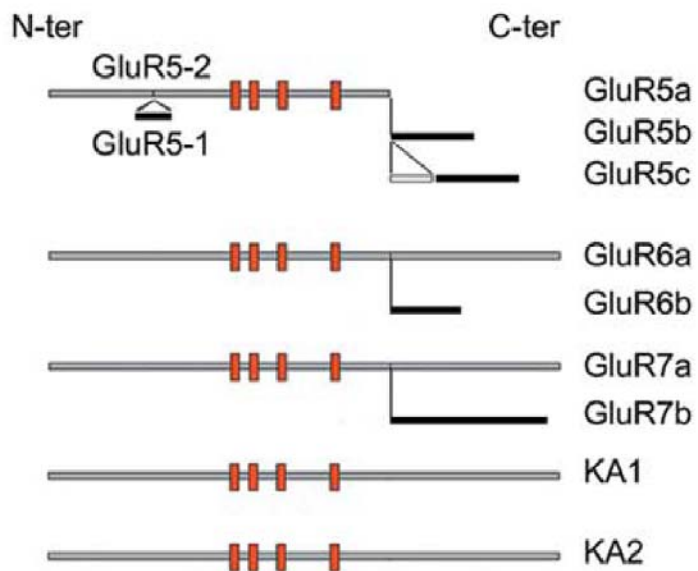
### III. 1. Diversité moléculaire des récepteurs kainate

Les gènes codant pour les récepteurs KA ont été clonés dans les années 1990. On distingue deux grandes familles de gènes:

- Les gènes de la famille GluR codent pour les sous-unités GluR5 (Bettler et al., 1990), GluR6 (Egebjerg et al., 1991) et GluR7 (Bettler et al., 1992) qui ont une faible affinité pour le KA ( $K_D = 50-100$  nM).
- Les gènes de la famille KA codent pour les sous-unités KA1 (Werner et al., 1991) et KA2 (Herb et al., 1992) qui ont une forte affinité pour le KA ( $K_D = 5-10$  nM).

Au sein de chaque famille, les gènes présentent environ 70% d'homologie de séquence entre eux. Par contre entre les gènes de ces deux familles il n'y a pas plus d'homologie de séquence qu'entre les gènes codant pour les récepteurs KA et les gènes codant pour les récepteurs AMPA (environ 40% d'homologie dans les deux cas).

Les sous-unités codées par les gènes de la famille GluR peuvent s'associer entre elles pour former des récepteurs homomériques et hétéromériques tandis que les sous-unités codées par les récepteurs de la famille KA doivent s'associer aux sous-unités codées par les récepteurs de



**Figure 17. Différents isoformes des sous-unités formant les récepteurs kainate**

la famille GluR pour pouvoir former des récepteurs KA fonctionnels (Swanson et al., 1996; Paternain et al., 2000; Cui and Mayer, 1999; Bettler et al., 1990; Schiffer et al., 1997). Les sous-unités des récepteurs KA ne peuvent s'associer avec les sous-unités des récepteurs AMPA pour former des récepteurs fonctionnels.

### III.1.1. Epissage alternatif des gènes codant pour les sous-unités GluR5, GluR6 et GluR7

Pour le gène codant la sous-unité GluR5, un premier type d'épissage au niveau N-terminal permet de différencier la sous-unité GluR5-1 qui contient 15 acides aminés supplémentaires par rapport à GluR5-2. Un second épissage au niveau C-terminal de GluR5-2 permet de différencier par ordre de taille : la sous-unité GluR5-2a pour laquelle l'épissage introduit un exon contenant un codon STOP au niveau de l'ARNm, la sous-unité GluR5-2b qui est non-épissée et la sous-unité GluR5-2c pour lequel l'épissage introduit un exon supplémentaire (Bettler et al., 1990; Fig. 17).

Pour le gène codant pour la sous-unité GluR7, l'épissage alternatif introduit une cassette de 40 nucléotides au niveau C-terminal de l'ARNm codant pour la sous-unité GluR7b ce qui la distingue de GluR7a (Schiffer et al., 1997).

Pour le gène codant pour la sous-unité GluR6 un épissage alternatif a été décrit au niveau C-terminal chez la souris uniquement (Gregor et al., 1993).

### III.1.2. Edition des ARNm codant pour les sous-unités GluR5 et GluR6

Comme la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA, les sous-unités GluR5 et GluR6 des récepteurs KA sont traduites à partir d'un ARNm qui peut être édité au niveau du codon du site Q/R du second segment transmembranaire. Les sous-unités traduites à partir de l'ARNm non édité présentent une glutamine neutre (Q) au niveau du site Q/R tandis que les sous-unités traduites à partir de l'ARNm édité présentent une arginine (R) chargée positivement à ce niveau. Comme pour les récepteurs AMPA, le second segment transmembranaire (TMII) participe à la formation du pore du canal. Un récepteur homomérique formé uniquement de sous-unités GluR6 éditées présente un anneau de charges positives à ce niveau qui diminuent fortement le passage des cations monovalents et empêche le passage de cations divalents. Ainsi, comme pour les récepteurs AMPA, l'édition au niveau du site Q/R peut fortement modifier la conductance élémentaire du canal, sa sélectivité ionique vis à vis des cations bi-polaires ainsi que le profil de sa courbe I/V. Mais contrairement aux

récepteurs AMPA pour lesquels 99.99 % des sous-unités GluR2 sont éditées chez l'adulte (Swanson et al., 1996) seuls 50-70% des sous-unités GluR5 et 75-80 % des sous-unités GluR6 des récepteurs KA sont éditées chez l'adulte (Sommer et al., 1991; Kohler et al., 1993; Burnashev et al., 1995; Paschen and Djuricic, 1995; Bernard et al., 1999; Bernard and Khrestchatisky, 1994). On peut donc imaginer que chez l'adulte, les récepteurs KA contenant la sous-unité GluR5 et pas la sous-unité GLUR6 seraient plus perméables au calcium que les récepteurs AMPA.

L'ARNm codant pour la sous-unité GluR6 peut également être édité au niveau de deux sites présents dans la région codante pour le premier segment transmembranaire (Kohler et al., 1993). Ces deux sites d'édition modifient également la perméabilité calcique des récepteurs homomériques contenant la sous-unité GluR6.

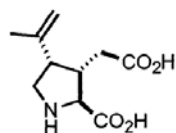
### III.2. Pharmacologie des récepteurs kainates

#### III.2.1. Agonistes utilisés dans l'étude des récepteurs kainate

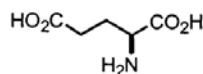
##### III.2.1.1 Les agonistes traditionnels

Historiquement, les premiers agonistes connus des récepteurs KA sont le KA lui-même et l'acide domoïque. Les agonistes des récepteurs KA natifs des neurones des racines dorsales de la moëlle épinière classés par ordre d'affinité sont domoate > KA >> L-glutamate > AMPA (Huettner, 1990; Debonnel et al., 1989). D'autres études utilisant la liaison de KA radioactif ([<sup>3</sup>H]KA) ont montré que l'affinité des récepteurs KA natifs au niveau du système nerveux central pouvaient varier selon les régions cérébrales étudiées. Ces premières études permirent notamment de distinguer des sites à haute affinité pour le KA radioactif de sites à basse affinité (Simon et al., 1976; London and Coyle, 1979; Monaghan and Cotman, 1982). L'expression des différentes sous-unités dans les systèmes hétérologues a permis de montrer que ces différentes affinités dépendent fortement de la composition en sous-unités des récepteurs. Ainsi, les sous-unités GluR5, GluR6 et GluR7 ont une faible affinités pour le KA ( $K_d \sim 50-100 \text{ nM}$ ; Bettler et al., 1992; Sommer et al., 1992). Parmi ces sous-unités, les récepteurs homomériques GluR5 serait plus affins pour le KA ( $EC_{50} = 33.6 \mu\text{M}$ ; Sommer et al., 1992) que les récepteurs homomériques GluR6 ( $EC_{50} = 299 \mu\text{M}$ ; Swanson et al., 1996) et beaucoup plus que les récepteurs homomériques GluR7 ( $EC_{50} > 1 \text{ mM}$  (Schiffer et al., 1997). Au contraire, les sous-unités KA1 et KA2 ont une plus grande

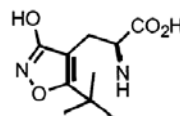
## Agonistes des récepteurs kainate



**Kaïnate (<3μM)**

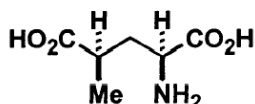


**Glutamate**



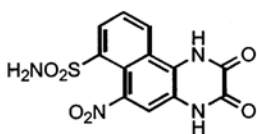
**ATPA**

## Antagoniste fonctionnel des récepteurs KA

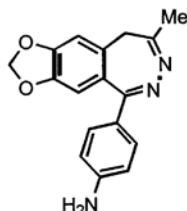


**SYM 2081 (10μM)**

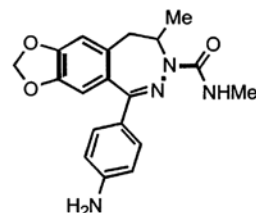
## Antagonistes des récepteurs AMPA



**NBQX (<1μM)**

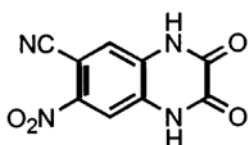


**GYKI 52466  
(100 μM)**

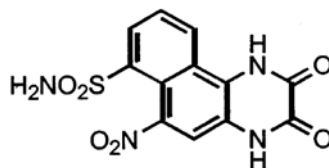


**LY 300168 (GYKI 53655)  
(50 μM)**

## Antagonistes mixtes AMPA/KA



**CNQX (50μM)**



**NBQX (10μM)**

**Figure 18. Agonistes et antagonistes des récepteurs AMPA et kainate utilisés dans notre étude**

affinité pour le KA ( $K_d \sim 4\text{-}15\text{nM}$ ; Herb et al., 1992; Wisden and Seeburg, 1993a) même si elles ne peuvent former de récepteurs KA fonctionnels. Pour ces sous-unités, l'affinité pour le KA est plus grande que pour le domoate et l'ordre des agonistes les plus affins devient KA > domoate > L-glutamate.

L'affinité des récepteurs hétéromériques dépend des sous-unités qui les forment. Ainsi, les récepteurs hétéromériques formés des sous-unités GluR et KA ont une affinité différente pour le KA que les récepteurs homomériques. Paradoxalement, alors que les récepteurs homomériques KA2 ont une plus grande affinité pour le KA ( $K_d \sim 15\text{nM}$ ), que les récepteurs homomériques GluR5 ( $K_d \sim 73\text{nM}$ ) les récepteurs GluR5/KA2 ont une plus faible affinité pour le KA ( $K_d \sim 90\text{nM}$ ; Herb et al., 1992; Howe, 1996; Swanson et al., 1996). Les récepteurs hétéromériques peuvent également être activés par des agonistes différents des récepteurs homomériques. Par exemple, l'application d'AMPA génère un courant au niveau des récepteurs GluR6/KA2 alors que les récepteurs homomériques GluR6 ne sont pas sensibles à l'AMPA (Herb et al., 1992). De même, les récepteurs hétéromériques GluR7a/KA1 et GluR7a/KA2 peuvent être activés par l'AMPA contrairement aux récepteurs homomériques GluR7a (Schiffer et al., 1997). Ces différences sont sans doute dues à la possibilité de fixation de l'AMPA au niveau des sous-unités KA1 et KA2. Enfin, malgré sa grande affinité, le KA reste un agoniste partiel des récepteurs KA. Ainsi, lors d'application d'agonistes à des concentrations saturantes, le courant induit par l'application de KA a une amplitude deux fois plus faible que le courant induit par application de glutamate.

#### III.2.1.2. Une nouvelle génération d'agonistes plus sélectifs

Récemment, des agonistes plus sélectifs ont été synthétisés pour la sous-unité GluR5 comme l'ATPA ( $EC_{50}=2.1\mu\text{M}$ ; Clarke et al., 1997), la (S)-5-iodowillardiine (I-will ;  $EC_{50}=140\text{nM}$ ; Wong et al., 1994). Mais la sélectivité de ces agonistes peut également être modifiée au niveau des récepteurs hétéromériques : alors que les récepteurs homomériques GluR6 sont complètement insensibles à l'ATPA, les récepteurs hétéromériques GluR6/KA2 sont sensibles à ce composé (Paternain et al., 2000). Des études structurales ont récemment montré que l'ATPA ne pouvait se fixer au niveau de la poche de liaison de la sous-unité GluR6 pour cause d'encombrement stérique (Mayer, 2005a). Donc la sensibilité des récepteurs GluR6/KA2 à l'ATPA est sans doute due à la fixation de cette molécule au niveau de la poche de liaison de la sous-unité KA2. L'affinité de l'ATPA est néanmoins plus faible pour les récepteurs GluR6/KA2 ( $EC_{50}=84\mu\text{M}$ ) que pour les récepteurs homomériques GluR5

ou les récepteurs hétéromériques GluR5/KA2 ( $EC_{50}=6.3\mu M$ ). Donc ce composé reste sélectif des récepteurs contenant la sous-unité GluR5 à faible concentration (jusqu'à  $1\mu M$  (Christensen et al., 2004). Le dernier agoniste des récepteurs KA est le SYM 2081 qui à une haute affinité pour les récepteurs homomériques GluR5 et GluR6 en raison de la formation de liaisons hydrophobes (Van der Walls) au niveau de la poche de fixation du ligand (Mayer, 2005a). Ce composé est souvent utilisé comme un antagoniste fonctionnel des récepteurs KA car il peut durablement désensibiliser ces récepteurs (Donevan et al., 1998; Jones et al., 1997).

### III.2.2. Antagonistes utilisés dans l'étude des récepteurs kainate

La synthèse d'antagonistes sélectifs des récepteurs KA manque cruellement à la recherche sur le rôle fonctionnel de ces récepteurs dans le système nerveux. En effet, la plupart des antagonistes sélectifs des récepteurs ionotropiques glutamatergiques non-NMDA comme le CNQX, le DNQX et le NBQX bloquent indistinctement les récepteurs AMPA et KA (Bleakman, 1999). Le NS-102 a été le premier antagoniste présenté comme sélectif des récepteurs KA sur la base d'expériences montrant qu'il empêchait la liaison du  $[^3H]KA$  à des membranes corticales (Johansen et al., 1993). Il a ensuite été montré, dans des systèmes hétérologues, que le NS-102 était 20 fois plus sélectif pour les récepteurs KA homomériques GluR6 que pour les récepteurs AMPA hétéromériques GluR2/GluR4 (Verdoorn et al., 1994). Cependant la sélectivité de ce composé a été mise en doute par des travaux montrant qu'au niveau de neurones d'hippocampes en culture, il inhibait avec la même sensibilité les courants résultant de l'activation des récepteurs AMPA et KA (Paternain et al., 1996). Plus récemment la société Lilly a synthétisé un ensemble de composés présentés comme des antagonistes sélectifs des récepteurs KA contenant la sous-unité GluR5, comme le LY294486, qui est plus sélectif pour les récepteurs homomériques GluR5 ( $IC_{50}=4\mu M$ ) que pour les récepteurs AMPA ( $IC_{50}=30-100\mu M$ ). De plus ce composé n'agit pas sur les récepteurs homomériques GluR6 et GluR7 (Clarke et al., 1997). Un autre composé, le LY382884 est encore plus sélectif pour les récepteurs homomériques GluR5 vis à vis des autres récepteurs homomériques et, plus important, des récepteurs AMPA (Bortolotto et al., 1999). Des données récentes montrent que le LY382884 bloque également les récepteurs hétéromériques GluR5/KA2, et GluR5/GluR6 mais n'affecte pas les récepteurs GluR6/KA2 (Christensen et al., 2004). Malheureusement, ces antagonistes ne sont pas disponibles commercialement. Ainsi la

caractérisation fonctionnelle des récepteurs KA repose en grande partie sur les antagonistes des récepteurs AMPA.

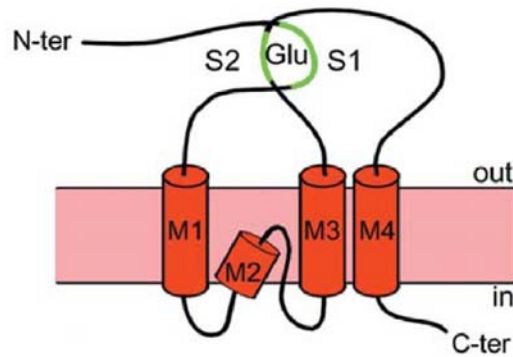
Les progrès récents dans l'étude du rôle fonctionnel des récepteurs KA natifs sont principalement dus à la synthèse d'antagonistes non-compétitifs sélectifs des récepteurs AMPA de la famille des 2,3-benzodiazepines. Parmi eux, le GYKI 53655 est le plus sélectif (Wilding and Huettner, 1995; Tarnawa and Vize, 1998). Il bloque complètement les récepteurs AMPA avec un  $IC_{50}$  de  $1\mu M$  sans bloquer les récepteurs KA même à  $30\mu M$ . Cependant à forte concentration ( $100\mu M$ ), le GYKI 53655 bloque partiellement les récepteurs KA (à hauteur de 50% (Frerking et al., 1998; Wilding and Huettner, 1995). Son dérivé, le GYKI 52466, disponible commercialement, a la même affinité pour les récepteurs AMPA et à forte concentration bloque aussi partiellement les récepteurs KA (Donevan and Rogawski, 1993). Le NBQX à faible concentration bloque également spécifiquement les récepteurs AMPA en affectant peu les récepteurs KA (Bureau et al., 1999; Mulle et al., 2000). Enfin le SYM 2206, un autre diastéréoisomère du 4-méthyl glutamate a également été utilisé pour bloquer sélectivement les récepteurs AMPA (Li et al., 1999; Pelletier et al., 1996; Rodriguez-Moreno et al., 2000).

### III.3. Structure des récepteurs kainate : implications fonctionnelles

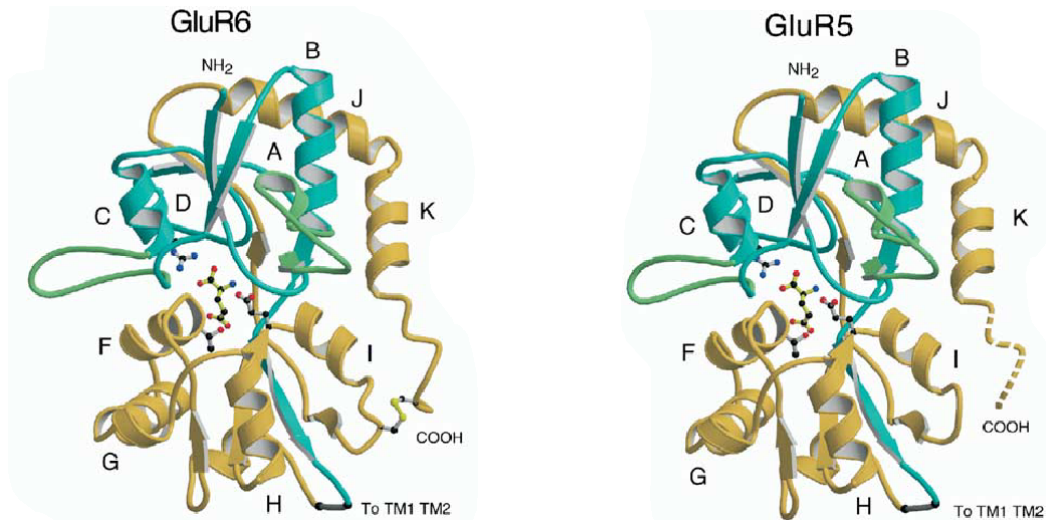
Les récepteurs KA comme les récepteurs AMPA sont formés de l'assemblage de quatre sous-unités (Rosenmund et al., 1998). Chaque sous-unité est une grande protéine transmembranaire (environ 900 acides aminés pour 100 KD) qui contient trois segments transmembranaires (TMI, TMIII et TMIV) et un segment pseudo-transmembranaire (TMII; Fig. 19). Comme pour les récepteurs AMPA, le site de fixation du L-glutamate se situe entre une partie S1 située au niveau N-terminal et une partie S2 située au niveau de la boucle entre TMIII et TMIV. Ces deux sites sont rapprochés dans l'espace et forment une structure en forme de coquillage (voir Fig. 19B et chapitre II). Comme les sites de liaisons ne se trouvent pas à l'interface entre deux sous-unités, comme c'est le cas pour les récepteurs GABAergiques ou nicotiniques, mais que chaque sous-unité possède son site propre de liaison, il est possible, comme pour les récepteurs AMPA, de faire exprimer une forme soluble de ce site de liaison par des bactéries (Gouaux, 2004; Mayer, 2005b). Après production d'une quantité suffisante pour en faire des cristaux, ceux-ci peuvent ensuite être analysés aux rayons X. Des données récentes utilisant cette technique pour les complexes S1S2 des sous-unités GluR6 et GluR5 montrent que la structure globale du site de liaison au



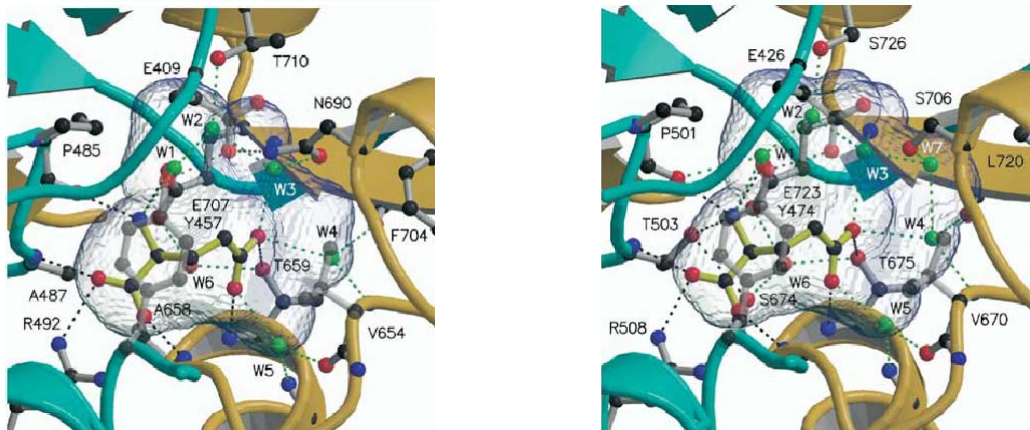
A



B



C



**Figure 19. Structure des récepteurs kainate**

A. Structure des sous-unités des récepteurs kainate.

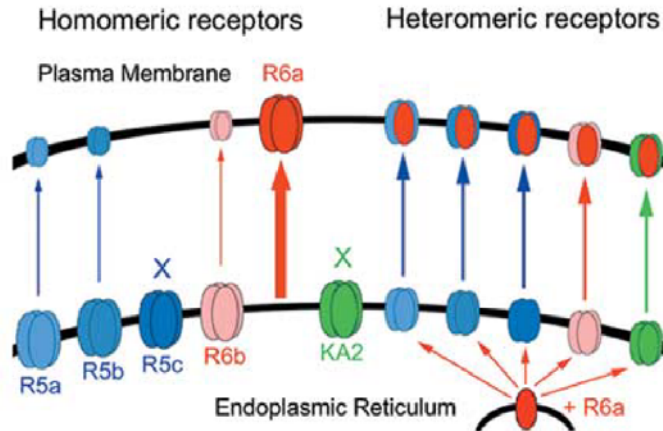
B. Représentation des complexes S1S2 des sous-unités GluR6 et GluR5 après liaison du glutamate.

C. Vue détaillée des sites de liaison du ligand pour les sous-unités GluR6 (gauche) et GluR5 (droite). Le glutamate est représenté entouré de molécules d'eau (en transparence).

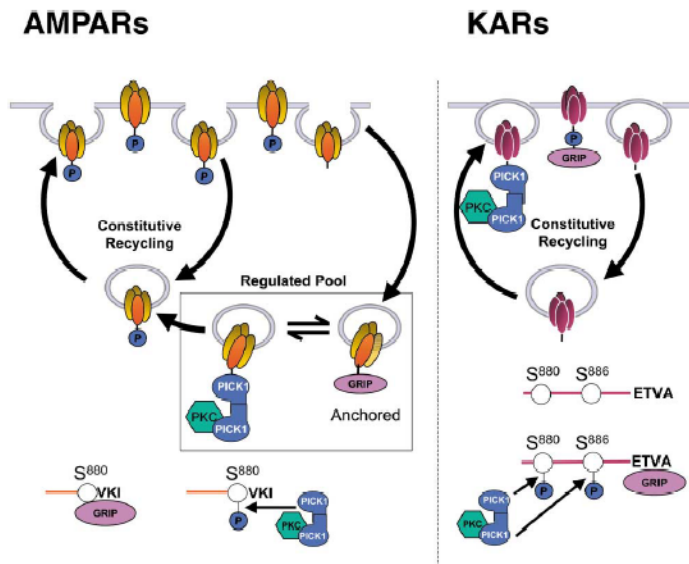
D'après Mayer 2005

L-glutamate est très proche de celle observée pour les récepteurs AMPA malgré 50% de différence dans les séquences en acides aminés qui participent à la formation de ce site (Mayer, 2005a). Comme au niveau des récepteurs AMPA, le L-glutamate se fixe à des résidus arginine, glutamate et thréonine dans la fente entre les domaines S1 et S2 (Fig. 19 B et C). Néanmoins, de petites différences au niveau des autres acides aminés permettent d'expliquer en partie la signature pharmacologique des différents sous-types de récepteurs glutamatergiques. Ainsi, les poches de liaison sont plus grandes pour GluR5 et GluR6 que pour GluR2 et celles-ci contiennent des molécules d'eau en plus du glutamate. Le déplacement de ces molécules d'eau par des agonistes plus encombrants (comme le KA voir Fig. 19C) permet leur fixation avec une plus grande affinité qu'au niveau de la poche de liaison GluR2 (Gouaux, 2004; Mayer, 2005a). Cette étude révèle aussi des différences permettant d'expliquer la pharmacologie particulière des sous-types de récepteurs au sein d'une même famille. Par exemple, la présence de résidus d'acides aminés moins encombrants stériquement au niveau de GluR5 explique l'existence d'agonistes sélectifs de cette sous-unité comme l'AMPA, l'ATPA et le 5-iodowillardine qui ne peuvent « physiquement » se fixer au niveau de GluR6. Ces travaux montrent enfin que le degré de fermeture du complexe S1S2 après fixation du L-glutamate au niveau de la poche de liaison GluR5 et GluR6 est plus important qu'après fixation du KA, ce qui expliquerait que le KA soit un agoniste partiel au niveau des récepteurs KA. Par contre, les degrés de fermeture du complexe S1S2 après fixation du L-glutamate au niveau de la poche de liaison de GluR6 est plus important qu'au niveau de la poche de liaison de GluR2 ce qui explique pourquoi, à concentration égale et saturante de L-Glutamate, les courants générés par la récepteurs KA homomériques GluR6 soient plus grands que les courants générés par les récepteurs AMPA. Comme nous l'avons vu pour les récepteurs AMPA, les domaines S1S2 s'associent en dimères et la force de cette association détermine l'efficacité du couplage entre fixation du ligand et ouverture du canal et est inversement corrélée à la désensibilisation (voir chapitre II). Les récepteurs KA GluR5 et GluR6 présentent des liaisons hydrogènes entre ces dimères similaires à celles observées pour les récepteurs AMPA flip qui les stabilisent (Mayer, 2005a).

A



B



**Figure 20. Régulation de l'adressage des récepteurs kainate à la membrane plasmique**

A. L'adressage de nombreuses sous-unités à la membrane plasmique dépend de la formation de récepteurs hétéromériques avec la sous-unité GluR6a.

B. Régulation dynamique et différente de l'adressage à la membrane des récepteurs AMPA et kainate par interaction avec les protéines PICK1 et GRIP.

D'après Jakolski et al., 2005 (A); Hirbec et al., 2003 (B)

### III.4. Adressage des récepteurs kainates à la membrane et régulation

#### III.4.1 Adressage des récepteurs kainates à la membrane

Les mécanismes d'adressage des récepteurs KA à la membrane n'ont été étudiés que récemment (pour revue voir Jaskolski et al., 2005). Comme les récepteurs AMPA, les récepteurs KA tétramériques sont assemblés dans le réticulum endoplasmique (ER) à partir de dimères (Ayalon and Stern-Bach, 2001b). La sortie des récepteurs KA du réticulum endoplasmique et l'adressage à la membrane dépend de la présence de séquences de rétentions riches en acides aminés chargés positivement au niveau C-terminal des récepteurs. Comme les différents variants des sous-unités formant les récepteurs KA varient essentiellement au niveau de leur région C-terminale (voir Fig. 17), il n'est pas étonnant qu'ils aient différentes capacités à sortir du ER pour être adressés à la membrane. Par exemple, les récepteurs homomériques KA2 ou GluR5c ne sont pas exprimés à la membrane mais restent confinés au sein du ER (voir Fig. 20A). Ces sous-unités ont en effet une séquence de rétention de type RXR au niveau C-terminal. Par contre, lorsque ces sous-unités forment des récepteurs hétéromériques avec la sous-unités GluR6a, qui contient une séquence de sortie du ER au niveau C-terminal, ils peuvent être exprimés à la membrane (Yan et al., 2004; Jaskolski et al., 2004). Les sous-unités GluR5b ont également une séquence riche en acides aminés chargés positivement qui tend à les retenir au niveau du ER mais comme cette séquence est partiellement masquée au niveau du récepteur homomériques, ceux-ci peuvent donc être détectés en faible quantité à la membrane (Jaskolski et al., 2005; Ren et al., 2003b).

#### III.4.2. Régulation par des protéines contenant des domaines PDZ

Comme les motifs de rétention sont présents au niveau C-terminal, on peut imaginer que des protéines qui interagissent avec ces domaines puissent réguler l'adressage des récepteurs à la membrane. Les protéines contenant des domaines PDZ comme la PSD-95 (protéine de 95 kDA présente au niveau de la densité post-synaptique), SAP102 (protéine de 102 kDA associée à la synapse), SAP97 (Garcia et al., 1998; Mehta et al., 2001), CASK (sérine/thréonine kinase associée à la calmoduline; Coussen et al., 2002), GRIP (protéine interagissant avec les récepteurs au glutamate), PICK1 (protéine interagissant avec la protéine kinase C1) et la synténine (Hirbec et al., 2003), interagissent avec la sous-unité GluR6a *in vitro* et *in vivo* au niveau des quatre derniers acides aminés. Les sous-unités GluR5b et

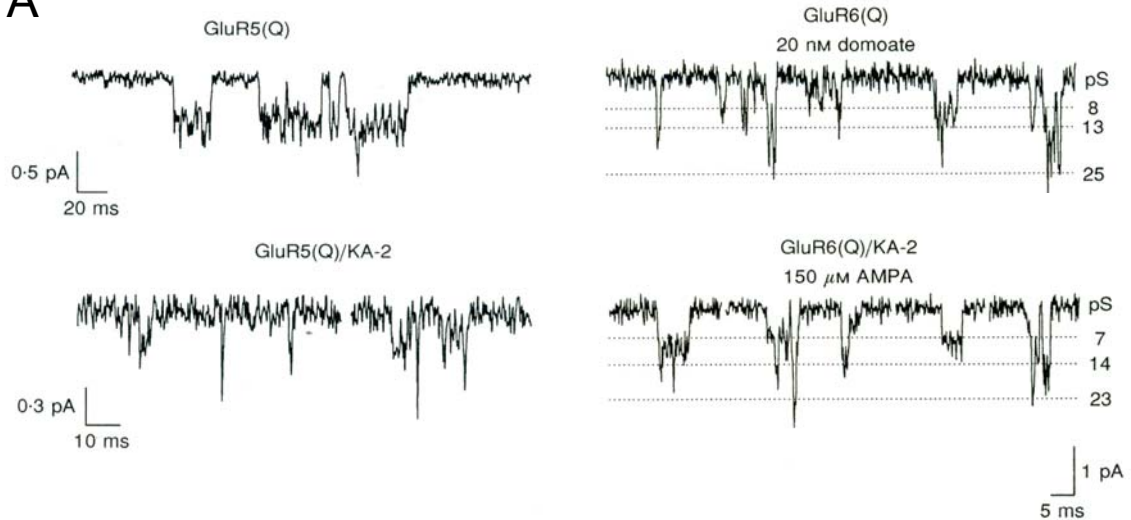
GluR5c interagissent également *in vitro* avec des protéines contenant des domaines PDZ. La délétion des domaines interagissant avec ces domaines PDZ n'empêche pas l'adressage des récepteurs KA à la membrane (Ren et al., 2003a; Ren et al., 2003b; Coussen et al., 2002). Cependant, l'interaction avec les protéines SAP90 et SAP102 permet le regroupement des sous-unités GluR6, KA2 et KA1 dans les systèmes hétérologues (Garcia et al., 1998). De plus ces protéines sont colocalisées dans les neurones hippocampiques en culture (Garcia et al., 1998). D'autres protéines à domaine PDZ interviennent dans la régulation dynamique du nombre de récepteurs à la membrane. Notamment, l'interaction des sous-unités GluR5<sub>2b</sub> et GluR6 avec les protéines PICK1 et GRIP est nécessaire à leur adressage post-synaptique (Hirbec et al., 2003). Ces protéines interagissent également avec les sous-unités des récepteurs AMPA, et la perturbation de ces interactions a des effets différents sur le nombre de récepteurs AMPA et KA au niveau post-synaptique. Ces résultats suggèrent des différences dans les mécanismes de régulation du nombre de récepteurs AMPA et KA au niveau post-synaptique (Hirbec et al 2003; Fig. 20B). Les récepteurs contenant la sous-unité GluR6a peuvent également interagir *in vivo* et *in vitro* avec les complexes d'adhésions de types cadhérine/caténine. Ces interactions pourraient contribuer au maintien des récepteurs contenant cette sous-unité dans les régions périssynaptiques enrichies en complexes cadhérine/caténine (Coussen et al., 2002).

### III.5. Propriétés fonctionnelles des récepteurs kainate dans les systèmes hétérologues

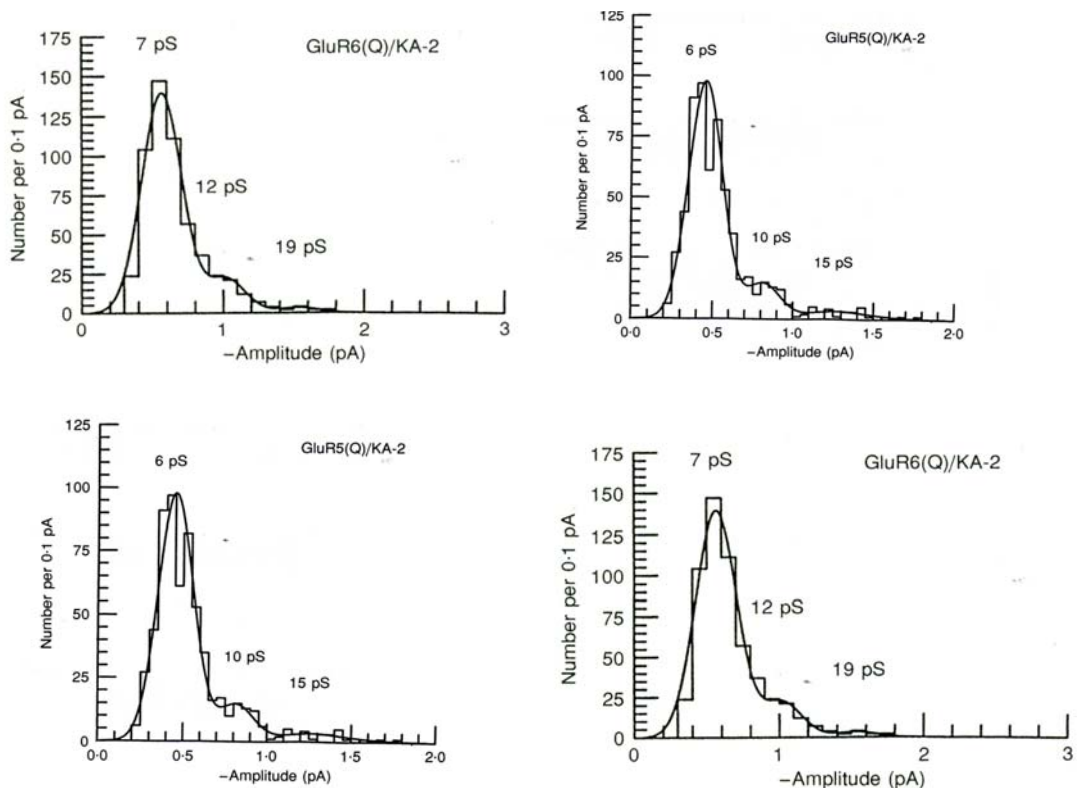
#### III.5.1. Conductances unitaires et perméabilité aux ions Ca<sup>2+</sup>

Parmi les cinq sous-unités qui forment les récepteurs KA, seules GluR5, GluR6 et GluR7 peuvent s'assembler pour former des récepteurs homomériques fonctionnels dans les systèmes hétérologues (Bettler et al., 1990; Egebjerg et al., 1991; Sommer et al., 1992). L'enregistrement de récepteurs KA homomériques unitaires formés de sous-unités non éditées GluR6(Q) révèle trois niveaux de conductances élémentaires en réponse à des applications de domoate : 8, 15 et 25 pS avec une conductance principale de 8 pS. Mais il se pourrait que des niveaux de conductances plus bas existent à la limite du niveau de bruit des enregistrements de canaux unitaires car des analyses de variance du bruit suite à des applications de KA révèlent une conductance moyenne plus basse de 5.4 pS. L'enregistrement de récepteurs KA homomériques formés de sous-unités non éditées GluR5(Q) révèle également trois niveaux de

A



B



**Figure 21. Conductances unitaires des récepteurs kainate exprimés dans un système hétérologue**

A. Courants unitaires enregistrés au niveau de récepteurs homomériques GluR5(Q) et GluR6(Q) et de récepteurs hétéromériques GluR5(Q)/KA2 et GluR6(Q)/KA2 en réponse à des applications de domoate (200 nM).

B. Histogramme d'amplitude des courants enregistrés au niveau des différents types de récepteurs.

D'après Swanson et al., 1996

conductances élémentaires 5, 9 et 25 pS avec une conductance principale de 5 pS (Swanson et al., 1996). De la même façon il se pourrait que des niveaux de conductances plus bas existent puisque les analyses de variance de bruit révèlent une conductance de 2.9 pS (Swanson et al., 1996). Contrairement aux récepteurs GluR6(Q) dont l'ouverture est assez brève, les récepteurs GluR5(Q) s'ouvrent en bouffées prolongées, suivies de longues périodes de fermeture (Swanson et al., 1996 ; Fig. 21A).

L'édition des ARNm codant pour ces sous-unités au niveau du site Q/R réduit sensiblement ces conductances unitaires à un seul niveau de conductance de l'ordre du femtosiemens (225 fS pour GluR6(R) et <200 fS pour GluR5(R)). Dans ce cas l'ouverture de canaux unitaires ne peut être détectée. Les sous-unités GluR 5-7 peuvent s'assembler avec les sous-unités KA1 et KA2 pour former des récepteurs KA hétéromériques. Ainsi, la co-expression des sous-unités GluR5(Q) ou GluR6(Q) avec la sous-unité KA2 permet de former des récepteurs hétéromériques qui, comme les récepteurs homomériques non-édités, présentent trois niveaux de conductance unitaire de l'ordre du pS (environ 7 pS pour GluR6(Q)/KA2 et 5 pS pour GluR5(Q)/KA2 ; Swanson et al., 1996; Fig. 21B). Les récepteurs hétéromériques GluR6(R)/KA2 et GluR5(R)/KA2 ont un niveau de conductance unique plus faible (700 fS pour GluR6(R)/KA2 et 950 fS pour GluR5(R)/KA2) mais supérieur à celui des récepteurs homomériques GluR6(R) et GluR5(R).

Les différentes sous-unités GluR5-7 peuvent également s'assembler pour former des récepteurs hétéromériques fonctionnels. Pour déterminer le rôle de l'édition des sous-unités GluR5 et GluR6 au niveau du site Q/R dans la conductance élémentaire et dans la perméabilité calcique, Cui et Mayer ont co-exprimé la forme non-éditée GluR5(Q) avec la forme éditée GluR6(R) et inversement. En utilisant un agoniste sélectif de la sous-unité GluR5 (le I-Will), ces auteurs sont arrivés à la conclusion que des formes éditées et non-éditées pouvaient s'associer pour former des récepteurs fonctionnels. En effet, lorsque la forme non-éditée GluR5(Q) était co-exprimée avec la forme éditée GluR6(R) la courbe I/V des courants induits par l'application de I-Will est linéaire. En faisant varier les proportions d'expression entre sous-unités éditées et non-éditées, ces auteurs ont pu montrer que chaque récepteur pouvait avoir une composition en sous-unité éditée variable (de 0 à 4 sous-unités) et que la proportion en sous-unité éditée au sein d'un récepteur déterminait sa conductance élémentaire. Ainsi un récepteur formé uniquement de sous-unités éditées a une conductance très faible (de l'ordre de 200 fS), un récepteur formé de deux sous-unités éditées et de deux sous-unités non éditées a une conductance plus élevée de l'ordre de 5 pS et un récepteur uniquement formé de sous-unités non-éditées a une conductance maximale de l'ordre de 25

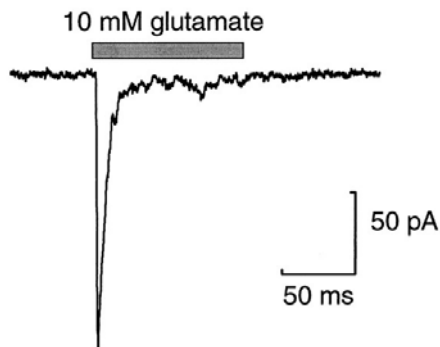
pS avec plusieurs niveaux de conductances intermédiaires (Cui and Mayer, 1999). Ce modèle permet de comprendre pourquoi les récepteurs hétéromériques formés des sous-unités GluR5(Q) ou GluR6(Q) avec KA2 ont un niveau de conductance comparable aux récepteurs homomériques GluR6(Q) ou GluR5(Q) (car tous ces récepteurs sont formés de quatre sous-unités non-éditées) et pourquoi les récepteurs hétéromériques GluR5(R)/KA2 et GluR6(R)/KA2 ont un niveau de conductance supérieur aux récepteurs homomériques GluR5(R) et GluR6(R) car ils contiennent des sous-unités KA2 qui ne sont jamais éditées. Ce modèle a été conforté récemment par les travaux de Swanson et ses collègues (2002) montrant que chaque sous-unité au sein d'un récepteur hétéromérique contribue par une conductance indépendante à la conductance globale du canal (Swanson et al., 2002).

Concernant la durée d'ouverture des canaux, la distribution du temps moyen d'ouverture n'est pas significativement différente pour les récepteurs hétéromériques GluR6(Q)/KA2 comparés aux récepteurs homomériques GluR6(Q). Au contraire, pour les récepteurs contenant la sous-unité GluR5, les récepteurs hétéromériques GluR5(Q)/KA2 s'ouvrent beaucoup moins longtemps que les récepteurs homomériques GluR5(Q). Ils ne présentent notamment pas d'ouverture en bouffées contrairement aux récepteurs homomériques GluR5(Q). Donc les changements de cinétique dus à la sous-unité KA2 semblent spécifiques de la sous-unité GluR5. Les études de probabilité d'ouverture montrent que pour les récepteurs homomériques GluR6 la probabilité d'ouverture au pic de la réponse est  $P_{o,peak}=0.5$  ce qui permet une modulation importante dans les deux sens par phosphorylation (voir ci-dessous).

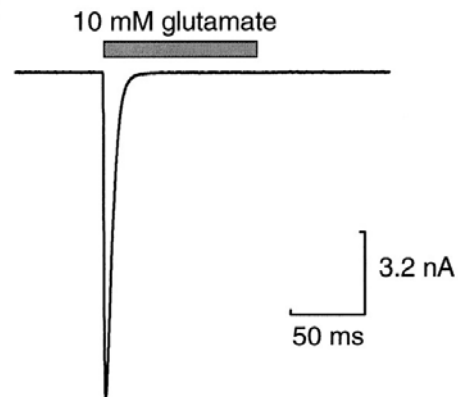
Comme pour les récepteurs AMPA, la perméabilité calcique dépend de l'édition des sous-unités GluR5 et GluR6 au niveau du site Q/R mais également au niveau des autres sites d'édition dans le premier segment transmembranaire (Egebjerg and Heinemann, 1993; Kohler et al., 1993; Swanson et al., 1997b). Ainsi, les récepteurs homomériques formés avec la forme complètement éditée de GluR6 (V,C,R) ont une perméabilité calcique très faible et une courbe I/V linéaire. L'anneau de charge positive dans les récepteurs homomériques complètement édités pourrait également favoriser le passage d'anions comme le chlore (Burnashev et al., 1996; Lerma et al., 2001). L'absence d'édition dans le second segment transmembranaire GluR6(V,C,Q) a pour effet d'augmenter la perméabilité calcique ( $P_{Ca}/P_M=0.39$ ). Lorsque aucun des segments transmembranaire n'est édité, le récepteur est encore plus perméable aux ions calcium ( $P_{Ca}/P_M=0.45$ ). Selon l'étude de Cui et Mayer, plus le nombre de sous-unité éditée est important au sein d'un récepteur et plus la courbe I/V est linéaire et moins celui-ci est perméable aux ions calcium (Cui and Mayer, 1999).



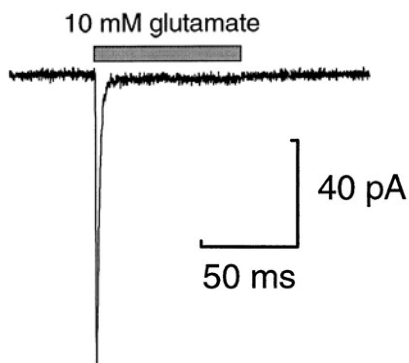
*GluR5*



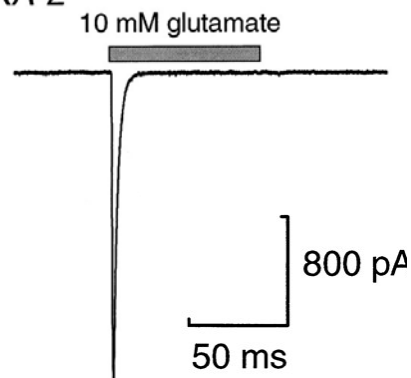
*GluR6*



*GluR5/KA-2*



*GluR6/KA-2*



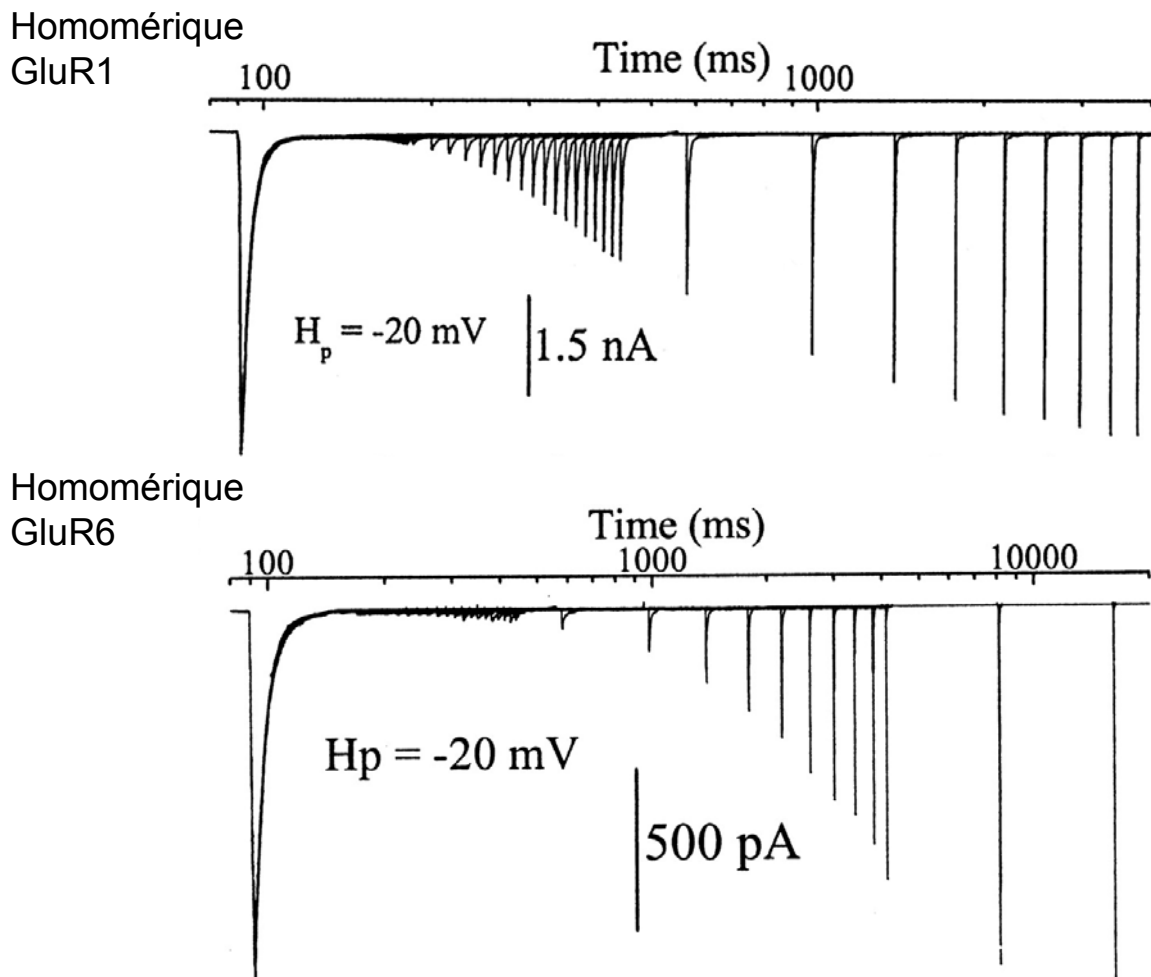
**Figure 22. Cinétiques de désensibilisation des récepteurs kainate homomériques et hétéromériques exprimés dans un système hétérologue**

D'après Swanson et al., 1998

### III.5.2. Cinétiques de désactivation, désensibilisation et resensibilisation

Les cinétiques de désactivation des récepteurs KA homomériques en réponse à des applications brèves (1ms) de concentrations saturantes de glutamate (10 mM) sont rapides (1-3 ms ; Bowie et al., 1998; Bowie, 2002; Heckmann et al., 1996). L'étude de la désensibilisation des récepteurs KA en réponse à des applications plus longues d'agoniste montre que les récepteurs KA homomériques et hétéromériques se désensibilisent rapidement et complètement en réponse au L-glutamate (Fig. 22). Cependant, l'analyse des réponses à d'autres agonistes donne des résultats très différents suivant : la nature de l'agoniste, les sous-unités qui forment les récepteurs KA et la forme éditée ou non-éditée de ces sous-unités (Kohler et al., 1993; Schiffer et al., 1997; Swanson et al., 1997a; Swanson and Heinemann, 1998; Swanson et al., 2002). Le KA entraîne ainsi une désensibilisation quasi-complète au niveau de récepteurs homomériques GluR5, GluR6, GluR7 mais avec des cinétiques de désensibilisation différentes. Des variabilités importantes ont notamment été rapportées pour les cinétiques de désensibilisation des récepteurs homomériques GluR5 (Swanson et al., 1997). Par contre, la désensibilisation est partielle au niveau des récepteurs hétéromériques GluR6(Q)/GluR5(R) et GluR6(R)/GluR5(Q) alors qu'elle est complète au niveau des récepteurs homomériques GluR6(Q), GluR6(R), GluR5(Q) et GluR5(R) (Cui and Mayer, 1999; Paternain et al., 2000). Ces résultats suggèrent que, contrairement à la perméabilité calcique et aux conductances unitaires, c'est l'association de sous-unités différentes et non l'édition de ces sous-unités qui est responsable des différences de désensibilisation. Globalement, comme pour les récepteurs AMPA, les cinétiques de désensibilisation sont très rapides (entre 1 et 10 ms). La similarité entre les cinétiques de désensibilisation des récepteurs AMPA et KA en réponse au L-glutamate dans les systèmes hétérologues (voir aussi chapitre II) et les différences de cinétique des événements synaptiques dus à l'activation de ces récepteurs AMPA et KA a longtemps posé question à la communauté scientifique (voir discussion).

Si les cinétiques de désensibilisation après application de L-glutamate sont sensiblement les mêmes pour les récepteurs AMPA et KA, on considère classiquement que les cinétiques de récupération après désensibilisation (re-sensibilisation) sont plus longues pour les récepteurs KA que pour les récepteurs AMPA (Fig. 23). En effet, la cinétique de récupération après désensibilisation pour des récepteurs homomériques GluR6 après application prolongée de glutamate (10s) est 10 fois plus lente que pour des récepteurs



**Figure 23. Différence de cinétique de resensibilisation des récepteurs AMPA et kainate dans un système hétérologue**

D'après Bowie et Lange., 2002

homomériques GluR1 (1s) (voir Fig. 23; Bowie and Lange, 2002). Comme les autres propriétés des récepteurs ionotropiques, le temps de re-sensibilisation varie selon les sous-unités qui forment le récepteur et selon la nature homomérique ou hétéromérique des récepteurs (Cui and Mayer, 1999; Swanson et al., 1998). La re-sensibilisation varie également selon l'agoniste utilisé : alors que les récepteurs homomériques GluR5 se re-sensibilisent complètement en 15 secondes après des applications prolongées de glutamate, il leur faut une minute pour se re-sensibiliser complètement après application de KA. Des études récentes des mécanismes de re-sensibilisation utilisant des données structurales suggèrent que la re-sensibilisation implique l'ouverture du site de liaison S1S2 suivie de la dissociation de l'agoniste puis un changement de conformation du site de dimérisation des complexes S1S2 (Robert et al., 2005). Ainsi, les différentes cinétiques de re-sensibilisation après application de glutamate et de KA pourraient s'expliquer en partie par les différentes affinités des récepteurs KA pour ces ligands. En accord avec ce modèle, les récepteurs hétéromériques GluR5/KA2 qui ont une moins grande affinité pour le KA se resensibilisent plus rapidement (en 12s Swanson et al., 1998). De la même façon, la capacité du SYM 2081 à maintenir les récepteurs KA dans l'état désensibilisé pourrait être due à sa très grande affinité.

### III.5.3. Modulation des propriétés des récepteurs kainate

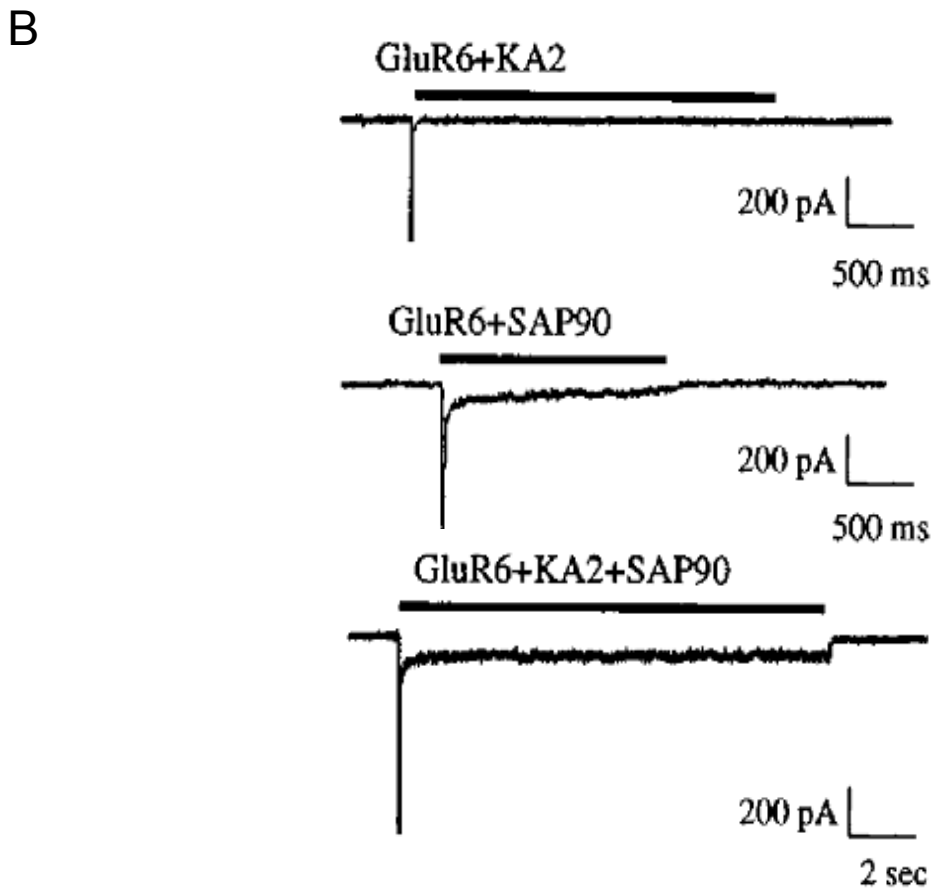
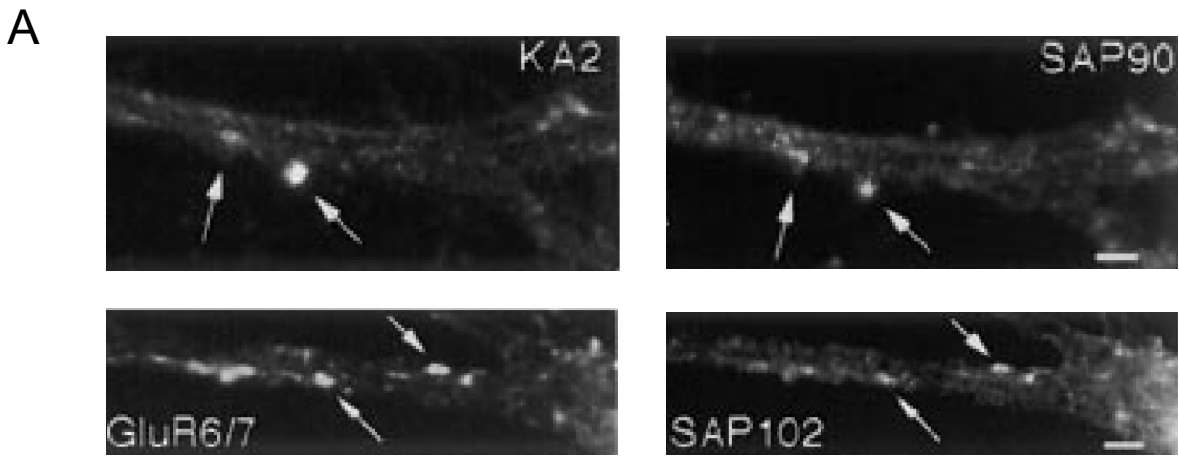
#### III.5.3.1. Probabilité d'ouverture et phosphorylation

Comme la plupart des récepteurs ionotropiques, les réponses des récepteurs KA peuvent être modifiées par phosphorylation. Par exemple, l'application de la partie catalytique de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) au niveau de la face interne du récepteur homomérique GluR6a entraîne une augmentation de l'amplitude de la réponse à des applications de glutamate (Raymond et al., 1993; Wang et al., 1993). Cette phosphorylation ne modifie pas la conductance élémentaire des canaux, ni leurs cinétiques d'activation ou d'inactivation mais leur probabilité d'ouverture (Traynelis and Wahl, 1997). Inversement, la calcineurine (une protéine phosphatase dépendante de la calcium-calmoduline) peut réduire la probabilité d'ouverture des récepteurs KA par déphosphorylation après augmentation de la concentration intracellulaire en ions  $\text{Ca}^{2+}$  suite à l'activation des récepteurs NMDA ou à l'activation des canaux calciques voltage-dépendants à haut seuil (Traynelis and Wahl, 1997; Ghatti and Heinemann, 2000). Une étude récente montre que la calcineurine exerce son effet en se fixant sur le variant GluR6b de la sous-unité GluR6 mais que l'effet n'est observé que si

GluR6b s'assemble avec GluR6a pour former un canal hétéromérique. Ainsi, GluR6b permettrait la fixation de la calcineurine et le site de phosphorylation permettant la régulation du récepteur se trouverait au niveau de la sous-unité GluR6a (Coussen et al., 2005). La phosphorylation par la protéine kinase calcium/calmoduline dépendante (CamKII) permet un retablisement de l'amplitude des courants après 10s (Ghetti and Heinemann, 2000). Les réponses médiées par les récepteurs KA peuvent également être régulées par phosphorylation par la protéine kinase C (Dildy-Mayfield and Harris, 1994) notamment suite à l'activation des récepteurs métabotropiques (Hirbec et al., 2003; Cho et al., 2003).

### III.5.3.2. Modulateur allostériques et cinétique de désensibilisation

Une molécule de la famille des lectines, la concanavaline A, réduit la désensibilisation rapide des récepteurs KA (Bowie et al., 2003; Mayer and Vyklicky, Jr., 1989; Partin et al., 1993; Wong and Mayer, 1993). Elle diminuerait l'entrée en désensibilisation ou augmenterait la resensibilisation des récepteurs kainate en se fixant à des résidus N-glycosylés de la partie N-terminale des sous-unités qui les forment (Everts et al., 1997; Everts et al., 1999). Cette molécule est active au niveau de toutes les sous-unités des récepteurs KA exprimées dans des systèmes hétérologues et des récepteurs natifs étudiés au niveau de neurones embryonnaires en culture (Lerma et al., 2001). Un autre mode de modulation allostérique impliquant les ions extracellulaires a été décrit par Bowie et ses collègues (2002). Les concentrations en cations extracellulaires (notamment les ions  $\text{Na}^+$ ) modifient les cinétiques de désactivation et désensibilisation des réponses dues à l'activation de récepteurs KA homomériques GluR6 mais sont sans effet sur les réponses dues à l'activation de récepteurs AMPA homomériques GluR1. Ainsi, des concentrations croissantes d'ions  $\text{Na}^+$  ralentissent la cinétique de désactivation et désensibilisation des récepteurs KA sans modifier celle des récepteurs AMPA. Les auteurs pensent que l'effet est allostérique car il est voltage indépendant, il ne dépend pas de la charge portée par le cation (les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  ont des effets différents sur les cinétiques de désactivation et désensibilisation aux mêmes concentrations) et seules les concentrations en ions extracellulaires mais pas les concentrations en ions intracellulaires sont efficaces (Bowie, 2002). Comme les récepteurs AMPA et NMDA, les récepteurs KA sont également modulés par les concentrations extracellulaires en ions  $\text{H}^+$ . Cet effet est différent selon les sous-unités qui forment les récepteurs. Ainsi les récepteurs homomériques GluR6 (Q) et hétéromériques GluR6(Q)/KA2 sont inhibés par acidification tandis que les récepteurs hétéromériques



**Figure 24. Désensibilisation incomplète après interaction avec des protéines à domaine PDZ**

A. Co-localisation des marquages KA2 et GluR6 avec respectivement les protéines SAP90 et SAP102.

B. Changement des cinétiques de désensibilisation après co-expression des sous-unités des récepteurs kainate avec la protéine SAP90.

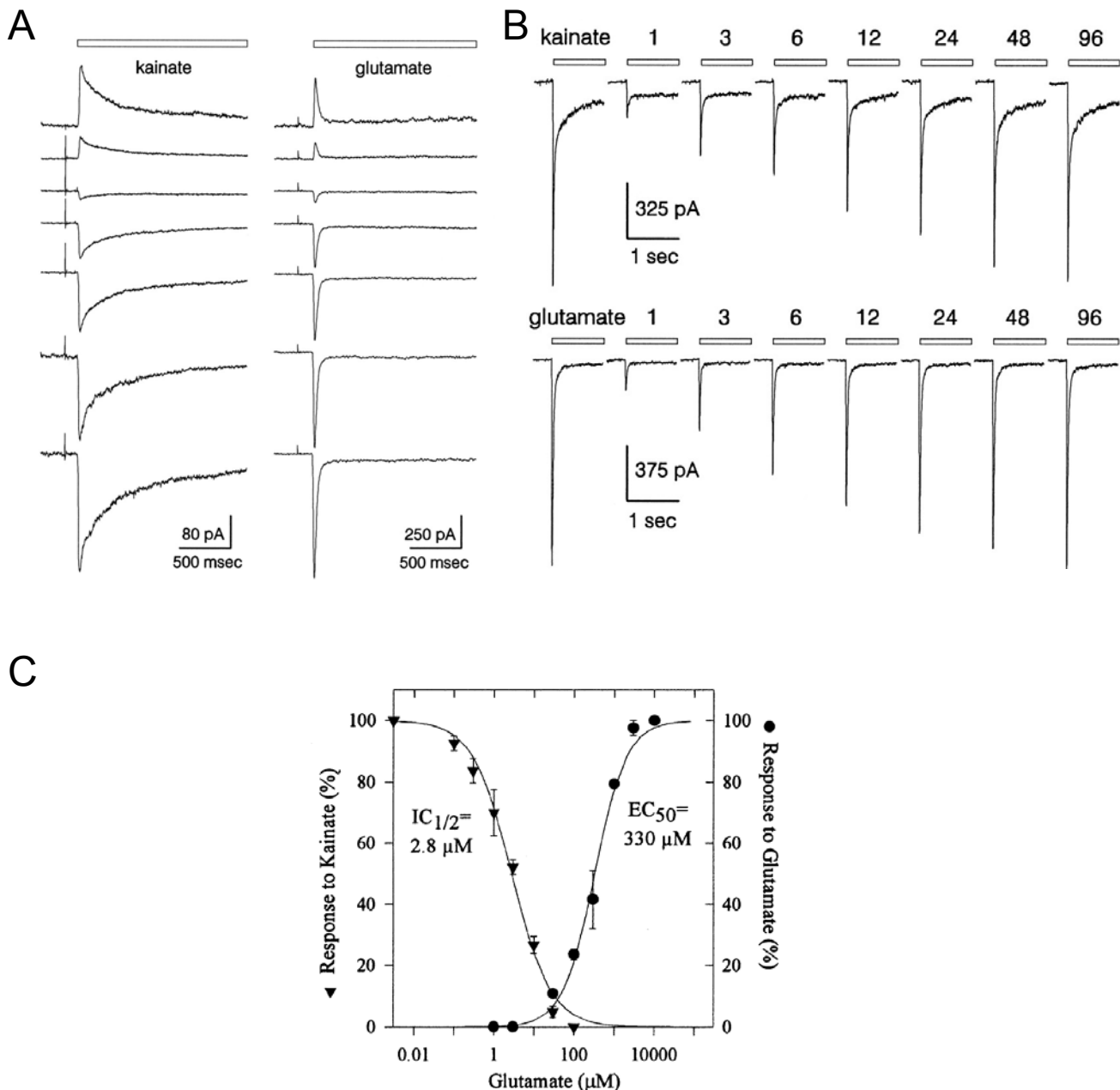
GluR6(Q)/KA1 sont potentialisés (Mott et al., 2003). Enfin, les récepteurs homomériques GluR6 (R) sont potentialisés par des polyamines endogènes comme la spermine de façon voltage-indépendante tandis que les récepteurs homomériques GluR6(Q) sont inhibés de façon voltage-dépendante (Mott et al., 2003). Le pH et les polyamines sont sans effet sur les cinétiques de désensibilisation des récepteurs KA.

#### III.5.3.3. Désensibilisation incomplète et interaction avec SAP90/PSD95

Les propriétés des récepteurs KA natifs peuvent être modifiées par interactions avec des molécules situées au niveau de la densité post-synaptique. Une interaction directe a notamment été mise en évidence entre la partie C-terminale des sous-unités GluR6 et KA2 et respectivement les domaines PDZ1 et SH3 de la molécule SAP90 de la famille de la PSD95. Ces interactions permettraient de regrouper les récepteurs KA au niveau post-synaptique (Fig. 24A). L'interaction avec les protéines SAP90/PSD95 modifie également la désensibilisation des récepteurs homomériques GluR6 et hétéromériques GluR6/KA2 en réponse à des applications prolongées de glutamate en induisant un courant non-désensibilisé (Garcia et al., 1998; Fig. 24B).

#### III.6. Les récepteurs kainate natifs

Les récepteurs KA natifs ont été dans un premier temps identifiés et localisés grâce à la révélation des sites de fixation du KA radioactif [<sup>3</sup>H]KA par autoradiographie. Ces premières expériences révèlent une large expression dans le cortex, (couche II, couche VI, cortex cingulaire, cortex entorhinal), dans l'hippocampe (principalement au niveau du gyrus denté et des cellules pyramidales de la région CA3), au niveau du thalamus notamment du noyau réticulé (Simon et al., 1976; London and Coyle, 1979; Monaghan and Cotman, 1982; Bahn et al., 1994), au niveau des noyaux gris centraux, noyau caudé et putamen, et au niveau du cervelet (cellules en panier et cellules granulaires). Ces premiers résultats ont ensuite été confirmés par hybridation in situ et immunohistochimie (Bahn et al., 1994; Petralia et al., 1994; Wisden and Seeburg, 1993a). Les premiers effets fonctionnels des récepteurs KA natifs ont quant à eux été observés après applications de faibles concentrations de KA exogène (~200nM). Deux effets principaux ont été observés, l'un sur l'excitabilité cellulaire (Robinson and Deadwyler, 1981; Westbrook and Lothman, 1983) et l'autre sur la modulation



**Figure 25. Cinétiques de désensibilisation et resensibilisation des récepteurs kainate natifs**

A. Cinétiques de désensibilisation des courants évoqués par des application de glutamate et de kainate au niveau de neurones dissociés d'hippocampe en présence d'un antagoniste des récepteurs AMPA.

B. Cinétiques de resensibilisation après application de glutamate et kainate au niveau des mêmes neurones.

C. Différence de concentration nécessaire à la désensibilisation et à l'activation des récepteurs kainate natifs.

D'après Wilding et Huettner 1997 (A,B) et Paternain et al., 1998 (C)



de la transmission synaptique (Collingridge et al., 1983; Kehl et al., 1984; Fisher and Alger, 1984). Etant donné les faibles concentrations de KA utilisées, ces effets sont vraisemblablement dus à l'activation spécifique de récepteurs KA. Cependant, l'étude sélective du rôle fonctionnel de ces récepteurs au niveau du système nerveux central n'a pu être abordé qu'après la découverte d'antagonistes sélectifs de récepteurs AMPA en 1995 (les 2,3 benzodiazépines dont le GYKI; Paternain et al., 1995; Pelletier et al., 1996; Wilding and Huettner, 1995). Suite à la synthèse de ces antagonistes et faute d'antagonistes sélectifs des récepteurs KA, un dogme s'est imposé à la communauté scientifique pour isoler pharmacologiquement les effets physiologiques dus à l'activation des récepteurs KA : ceux-ci doivent pouvoir être observés en présence d'antagonistes sélectifs des récepteurs AMPA et bloqués par des antagonistes mixte des récepteurs AMPA et KA tels que le CNQX (Frerking and Nicoll, 2000). L'utilisation de ces outils a permis de confirmer le rôle des récepteurs KA dans la modulation de l'excitabilité cellulaire, dans la transmission synaptique excitatrice et dans la modulation de la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses excitatrices et inhibitrices (Frerking and Nicoll, 2000; Huettner, 2003; Lerma et al., 1997; Lerma et al., 2001).

### III.6.1. Propriétés fonctionnelles unitaires des récepteurs kainate natifs

Une des premières études concernant les propriétés des récepteurs KA natifs a été réalisée au niveau de neurones de la racine dorsale de la moëlle qui expriment préférentiellement les récepteurs KA. Les auteurs étudient des récepteurs ayant les propriétés pharmacologiques des récepteurs KA (comme une affinité préférentielle pour le KA et le domoate et un ralentissement de la désensibilisation par la concanavaline A (Huettner, 1990). L'étude des conductances unitaires révèle trois niveaux de conductance avec une conductance moyenne autour de 2-4 pS. Ces niveaux sont équivalents à ceux observés pour les récepteurs GluR5(Q) et GluR5(Q)/KA2 dans les systèmes hétérologues. D'autres études au niveau des cellules granulaires du cervelet révèlent une conductance moyenne d'environ 1pS (Pemberton et al., 1998). L'utilisation d'antagonistes sélectifs des récepteurs AMPA permet ensuite d'isoler les courants spécifiquement dus à l'activation des récepteurs KA dans les cellules d'hippocampe dissociées (Wilding and Huettner, 1997; Paternain et al., 1998; Fig. 25). L'étude des cinétiques de désensibilisation de ces courants révèle que les récepteurs KA se désensibilisent rapidement en réponse à des activations prolongées de récepteurs (Wilding and Huettner, 1997; Paternain et al., 1998; Fig. 25). Certains auteurs rapportent une

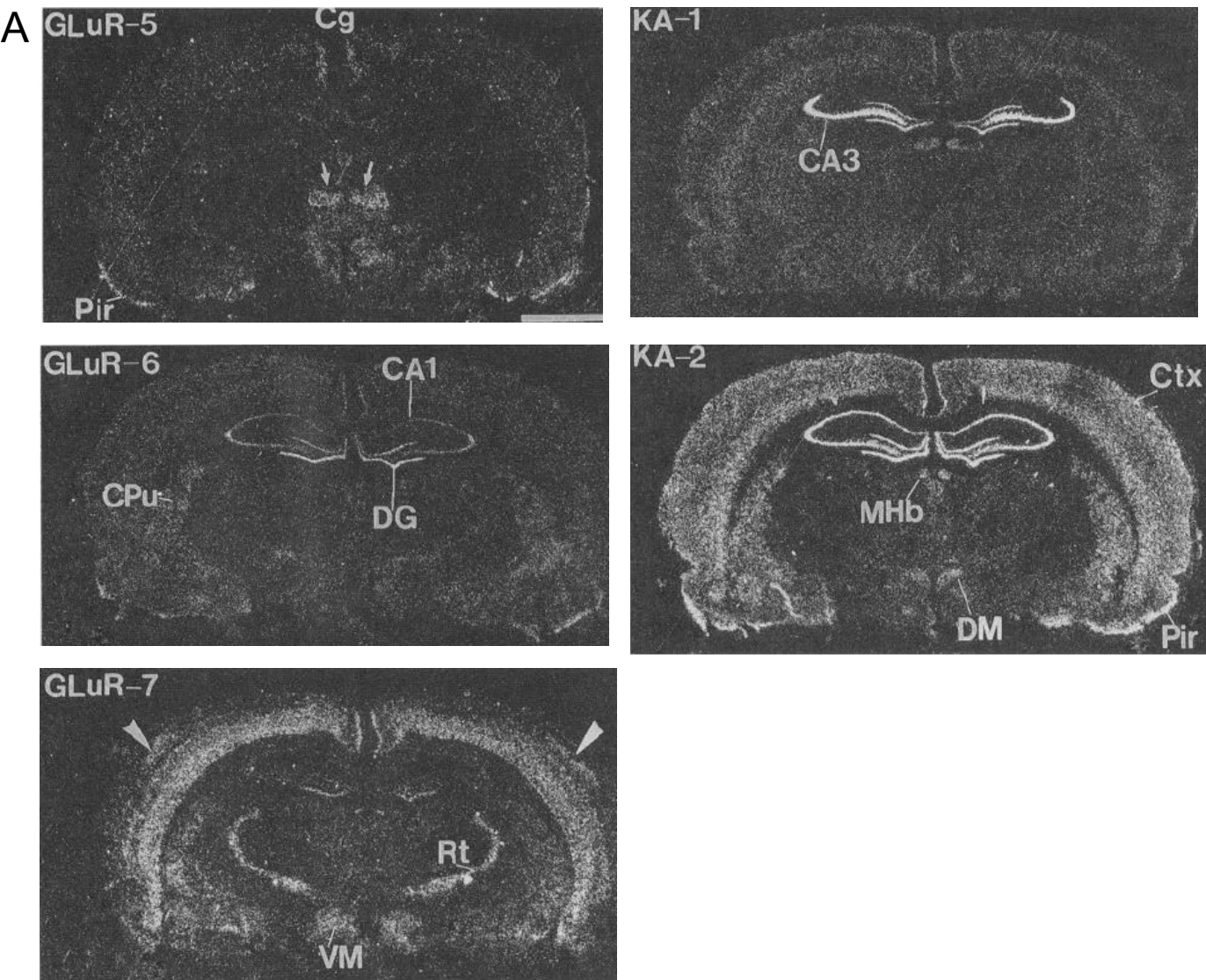
désensibilisation complète identique à celle observée pour des récepteurs homomériques GluR6 exprimés dans des systèmes hétérologues (Paternain et al., 1998), tandis que d'autre rapportent qu'une partie du courant est non désensibilisée (Wilding and Huettnner, 1997). Ces différences peuvent être dues aux différences d'âge des rats utilisés dans les deux études mais également à des différences inter-cellulaires en terme de sous-unités exprimées (Wilding and Huettnner, 1997). Les courants ont une courbe I/V linéaire ce qui suggère que les sous-unités qui forment les récepteurs KA sont principalement sous leur forme éditée. Comme pour les récepteurs KA exprimés dans les systèmes hétérologues, les cinétiques de resensibilisation sont lentes (entre 15s : Paternain et al., 1998 et 100s : Wilding and Huettnner, 1997 pour une resensibilisation complète).

En conclusion, les propriétés des récepteurs KA natifs ne diffèrent pas significativement des propriétés des récepteurs KA exprimés dans les systèmes hétérologues. Les caractéristiques principales sont une désensibilisation rapide et une resensibilisation lente. Il faut cependant garder à l'esprit qu'une partie importante des récepteurs KA activés dans ces conditions a une localisation extrasynaptique. Les propriétés des récepteurs KA post-synaptiques notamment en terme de désensibilisation pourraient être différentes du fait de leur interaction avec des protéines de la densité post-synaptique (Garcia et al., 1998).

### III.6.2. Distribution des récepteurs kainate natifs dans la formation hippocampique

#### III.6.2.1. Dans les cellules principales

La présence de récepteurs KA dans les cellules principales de la formation hippocampique est révélée dès les premiers travaux d'autoradiographie. Ces travaux rapportent un marquage important au niveau des couches des cellules principales du gyrus denté et de la région CA3 de l'hippocampe et moins important au niveau des cellules principales de la région CA1. Le stratum lucidum de la région CA3, la zone de projection des fibres moussues (voir chapitre I), présente également des sites de liaisons à haute affinité (Monaghan and Cotman, 1982; Foster et al., 1981) qui disparaissent après destruction des cellules granulaires et dégénérescence des fibres moussues suggérant une localisation pré-synaptique des récepteurs (Represa et al., 1987). Les travaux d'hybridation in situ montrent que toutes les sous-unités des récepteurs KA sont exprimées dans les cellules principales de la formation hippocampique (Paternain et al., 2000; Bureau et al., 1999; Wisden and Seeburg, 1993a; Bettler et al., 1990; Egebjerg et al., 1991; Herb et al., 1992; Werner et al., 1991; Schiffer



**B**

	GluR-5	GluR-6	GluR-7	KA-1	KA-2
<b>Hippocampus</b>					
Dentate gyrus	0	++	++	+++	++++
CA1 pyramidal	(+)	+	(+)	(+)	++++
CA3 pyramidal	0	+	(+)	++++	++++

**Figure 26. Expression des sous-unités des récepteurs kainate dans le cerveau de rat adulte**

A. Révélation par autoradiographie des ARNm codant pour les sous-unités des récepteurs kainate après hybridation in situ.

B. Taux d'expression dans les différentes régions de la formation hippocampique. 0: non détecté; (+) limite de détection; +: détectable; ++: modéré; +++: abondant; ++++: très abondant.

D'après Wisden et Seeburg., 1993

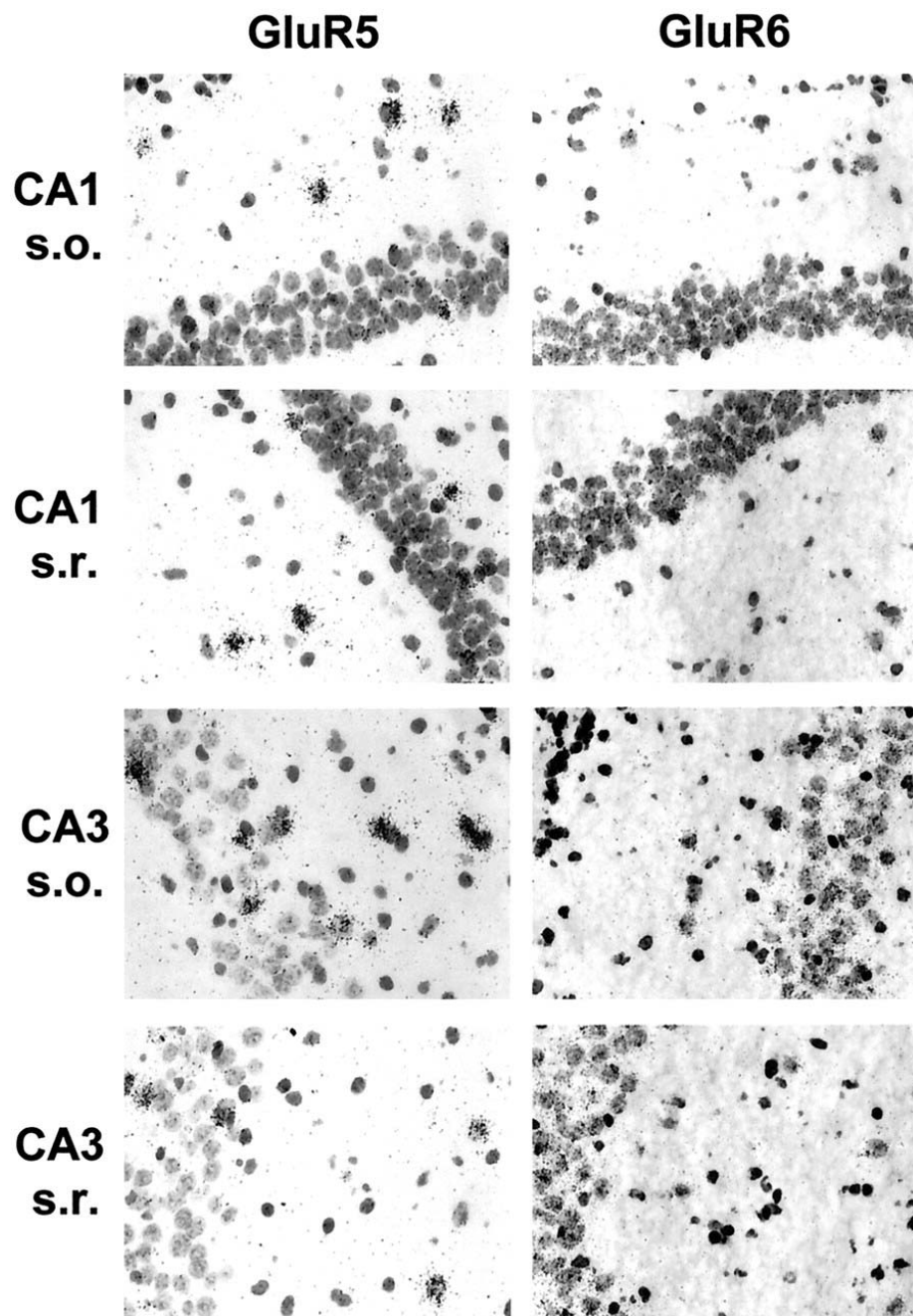
et al., 1997; Bahn et al., 1994). Les cellules du gyrus denté expriment principalement les sous-unités KA2 et GluR6 et dans une moindre mesure les sous-unités KA1, GluR5 et GluR7 (Fig. 26). Les données immunohistochimiques pour les anticorps dirigés contre les sous-unités KA2 et GluR6/7 révèlent un marquage assez faible (indice 1) au niveau du soma des cellules granulaires et du neuropile de la couche moléculaire interne (1.5) et externe (1) (Petràlia et al., 1994). Au niveau du hilus, l'hybridation in situ pour la sous-unités GluR6 révèle un grand nombre de cellules marquées (Paternain et al., 2000). Ce résultat est conforté par les résultats immunohistochimiques qui révèlent un marquage important pour les anticorps anti GluR6/7 (indice 2-3) et surtout pour les anticorps anti-KA2 (indice 3-4) au niveau du corps cellulaire et des dendrites. Cependant la nature exacte (cellules moussues ou interneurones) de ces cellules n'a pas été déterminée.

Les cellules pyramidales de la région CA3 expriment principalement les sous-unités GluR6, KA2 (à un même niveau que les cellules granulaires) et la sous-unité KA1 (plus que les cellules granulaires) mais pas les sous-unités GluR5 ni GluR7 (Bahn et al., 1994; Wisden and Seeburg, 1993a). Les données immunohistochimique rapportent un marquage important au niveau du corps cellulaire (indice 2.5-3) et des dendrites proximaux ainsi qu'un marquage du neuropile dans les *strata lucidum*, *oriens*, *radiatum* et dans le *lacunosum moleculare* (Petràlia et al., 1994). Alors que les cellules pyramidales de CA3 et les cellules granulaires semblent exprimer le même niveau de sous-unité des récepteurs KA, le marquage en immunohistochimie est beaucoup moins important au niveau des cellules granulaires (Petràlia et al., 1994) ce qui suggère un adressage différent de ces sous-unités dans ces deux types cellulaires.

Les cellules pyramidales de la région CA1 expriment principalement les sous-unités GluR6 et KA2 mais plus faiblement que les cellules pyramidales de la région CA3 et pas les sous-unités KA1, KA2 ni GluR5 (Bahn et al., 1994; Wisden and Seeburg, 1993a). En accord avec ces résultats, un marquage est visible en immunohistochimie au niveau du corps cellulaire et des dendrites pour les anticorps anti GluR6/7 (indice 1.5-2.5) et KA2 (indice 2-2.5) moins important qu'au niveau de CA3 (Petràlia et al., 1994).

### III.6.2.2. Dans les interneurones

En hybridation in situ, le marquage de cellules en dehors de la couche pyramidale, vraisemblablement des interneurones, a été rapporté pour les sous-unités GluR5 (Bahn et al., 1994; Bureau et al., 1999; Paternain et al., 2000), GluR6 (Bureau et al., 1999; Paternain et al.,



**Figure 27. Expression des sous-unités GluR5 et GluR6 par les interneurones des strata radiatum et oriens de CA1 et CA3**

2000) et GluR7 (Wisden and Seeburg, 1993a; Fig. 27). Les cellules exprimant la sous-unité GluR5 semblent particulièrement abondante dans le stratum oriens de la region CA1 mais sont également présentes dans le *stratum oriens* de la région CA3 et dans le *stratum radiatum* des régions CA1 et CA3 (Bureau et al., 1999; Paternain et al., 2000). Des études quantitatives utilisant un double marquage avec la glutamic acid decarboxylase (GAD) montrent que 50% des interneurons dans le *stratum oriens* de CA1 expriment la sous-unité GluR5, 30% dans la couche des cellules pyramidales et 14% dans le stratum radiatum (Paternain et al., 2000). Pour la région CA3, 30% des interneurons dans les *strata oriens* et *pyramidale* expriment la sous-unité GluR5 et seulement 20% dans le *stratum radiatum/lacunosum moleculare*. Inversement, comme l'indiquait déjà leur distribution principalement en dehors de la couche des cellules pyramidales, la majorité des neurones exprimant GluR5 sont des interneurons (86%; *ibid*). Pour la sous-unité GluR6, les résultats diffèrent sensiblement entre les régions CA1 et CA3. Dans la région CA1, seuls les interneurons présents dans la couche pyramidale expriment massivement la sous-unité GluR6 tandis que dans la région CA3, la grande majorité des interneurons situés dans les *strata oriens*, *pyramidale* et *radiatum/lacunosum moleculare* expriment la sous-unité GluR6 (Paternain et al., 2000). De la même façon, la grande majorité des cellules immunopositives pour la sous-unité GluR6 sont immunopositives pour la GAD (>95% en dehors du *stratum pyramidale* où la plupart des cellules pyramidales de CA3 expriment la sous-unité GluR6). Dans le stratum lucidum, de nombreuses cellules expriment la sous-unité GluR6 et celle-ci est majoritairement co-exprimée avec la GAD (97%). Comme nous l'avons vu de très nombreuses cellules du hilus expriment également la sous-unité GluR6 mais la colocalisation avec la GAD n'a pas été étudiée.

### III.6.3. Rôle physiologique des récepteurs kainate dans l'hippocampe

#### III.6.3.1. Après application exogène de kainate

L'effet de l'application de faibles doses de KA au niveau cellulaire a été étudié bien avant le clonage des récepteurs KA (Robinson and Deadwyler, 1981; Westbrook and Lothman, 1983). Ces applications induisent une dépolarisation tonique et une augmentation de la fréquence de décharge au niveau des cellules pyramidales de la region CA1 (Cherubini et al., 1990; Westbrook and Lothman, 1983) et CA3 (Westbrook and Lothman, 1983; Robinson and Deadwyler, 1981; Ben Ari and Gho, 1988). Ces effets ont ensuite été observés en présence d'antagonistes des récepteurs AMPA et bloqués en présence d'antagonistes des

récepteurs AMPA et KA (Castillo et al., 1997b) ou chez les souris mutantes pour les sous-unités codant pour les récepteurs KA (Mulle et al., 1998; Fisahn et al., 2004). Ces courants peuvent également être induits au niveau des interneurons de la région CA1 (Frerking et al., 1998; Cossart et al., 1998) et CA3 (Fisahn et al., 2004). Cette dépolarisation globale des cellules principales et des interneurons suite à l'application de faibles concentrations de KA (300nM) conduit rapidement chez le rat à des activités hypersynchrones de types épileptiformes (Westbrook and Lothman, 1983; Gaiarsa et al., 1994; Fisher and Alger, 1984; Ben Ari and Gho, 1988). Chez la souris, l'application de quantités identiques ou supérieures de KA (jusqu'à 600nM) entraîne la genèse d'oscillations rapides (~40 Hz ; rythme gamma) de l'activité de réseau enregistrée en extracellulaire (Fisahn et al., 2004). Ces oscillations semblent liées à l'action dépolarisante du KA car leur amplitude augmente avec la concentration de KA utilisée. Au-delà d'une certaine concentration (1μM) l'oscillation disparaît (Fisahn et al., 2004). Les différences inter-espèces des effets de l'application exogène de KA pourraient être dues à des différences de sous-unités exprimées, ou de sensibilité des récepteurs au KA (de telles différences ont récemment été décrite entre les récepteurs KA humains et de rats (Alt et al., 2004).

#### III.6.3.1.1. Inhibition de $I_{AHP}$ par de faibles concentrations de kainate

Un autre effet des récepteurs KA extrasynaptiques, non directement lié à une dépolarisation, a été observé au niveau des cellules pyramidales de CA1. Dans ces cellules, l'application de faibles doses de KA (200 nM) augmente le nombre de potentiels d'actions évoqués en réponse à une injection de courant dépolarisant (Cherubini et al., 1990). Cet effet n'est pas du à un changement du potentiel membranaire du neurone post-synaptique car ce potentiel est maintenu au niveau observé avant l'application de KA. Cet effet s'accompagne d'une diminution du courant hyperpolarisant calcium dépendant observé après l'émission d'un potentiel d'action ( $I_{AHP}$ ; Cherubini et al., 1990) et d'une diminution des courants potassiques calcium dépendants  $I_H$  (Gho et al., 1986). Une fois de plus, au vu des concentrations de KA utilisées, ces effets sont vraisemblablement dus à une activation spécifique des récepteurs KA. Des études récentes ont reproduit l'effet du KA sur  $I_{AHP}$  en présence d'antagonistes sélectifs des récepteurs AMPA et montrent que l'effet est bien du à l'activation des récepteurs KA car il est bloqué par le CNQX (Melyan et al., 2002) et chez les souris mutantes *GluR6*<sup>-/-</sup> (Fisahn et al., 2005). Une autre étude montre que ces effets sont dus à une action métabotrope des récepteurs KA via l'activation des protéines G et de la PKC

(Melyan et al., 2004). L'effet sur l'excitabilité intrinsèque est beaucoup plus long que l'application de KA (30 min) et pourrait constituer un exemple de modification à long terme de l'excitabilité cellulaire (Melyan et al., 2004). De plus, ces effets peuvent également être induits par le glutamate libéré synaptiquement après stimulation à haute fréquence (5 stimulations à 100 Hz) des fibres afférentes. Ces effets sont observés en l'absence de courant post-synaptique et pourraient être dus à l'activation de récepteurs KA péri-synaptiques (Coussen et al., 2002). Ces résultats montrent enfin que deux types de récepteurs KA sont exprimés au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 : (i) des récepteurs canaux dont l'activation induit un courant tonique et (ii) des récepteurs métabotropiques dont l'activation entraîne via une cascade de second messenger la diminution de l'AHP. Des expériences complémentaires permettront de dire si ces deux types de récepteurs sont différents.

#### III.6.3.1.2. Inhibition des potentiels d'actions calciques

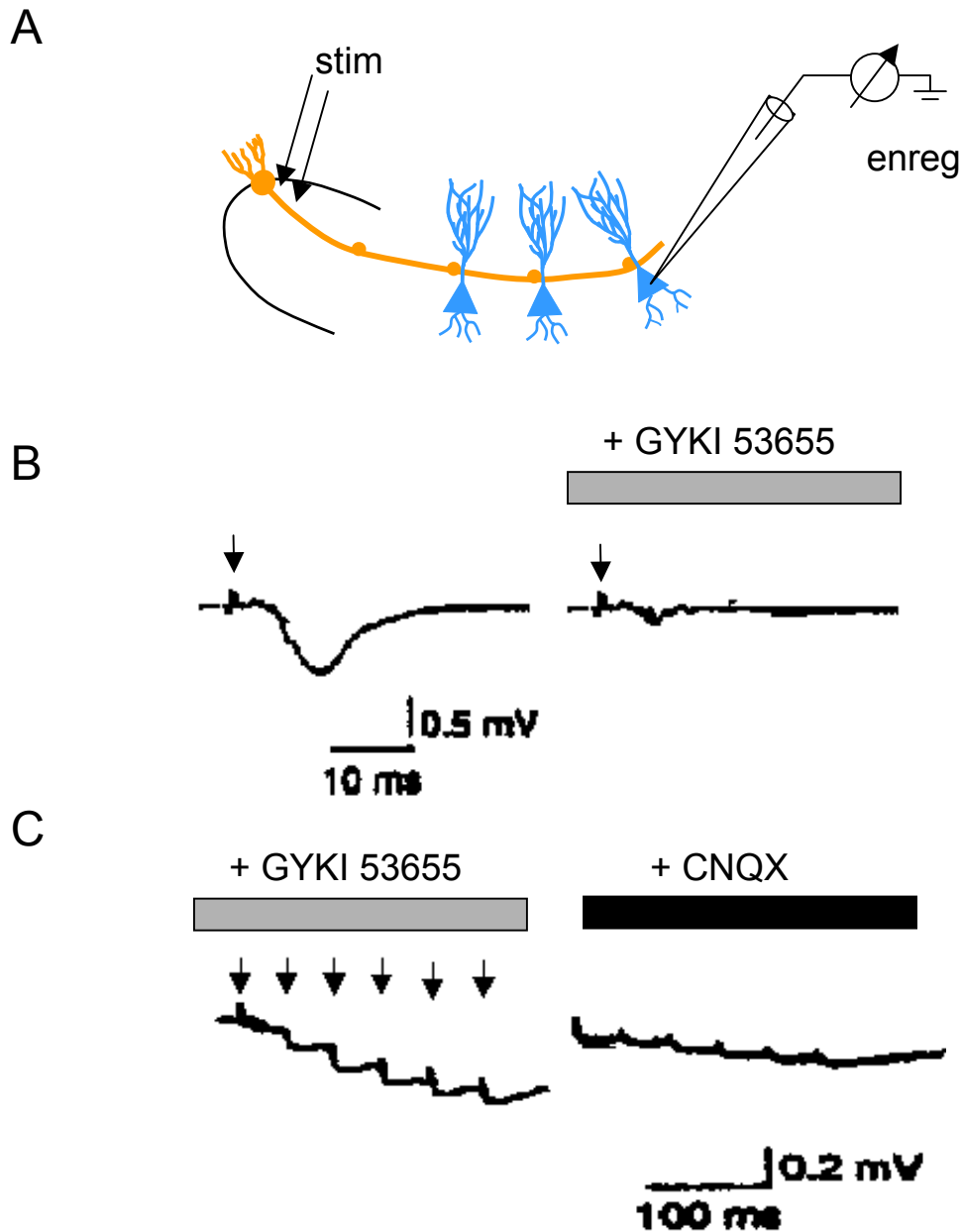
L'activation des récepteurs KA par de faibles quantités de KA (50nM) produit une diminution de l'amplitude des potentiels d'actions calciques enregistrés dans les cellules pyramidales de CA1 (Cherubini et al., 1990). Cet effet est également indépendant de la dépolarisation des cellules pyramidales et pourrait être du à une inhibition directe des canaux calciques (Nistri and Cherubini, 1991). Ces expériences n'ont pas, à notre connaissance, été reproduites en présence d'antagoniste des récepteurs AMPA et les mécanismes impliqués sont à l'heure actuelle inconnus.

#### III.6.3.2. Courants synaptiques dus à l'activation de récepteurs kainate

##### III.6.3.2.1. Au niveau des cellules principales

La démonstration de l'existence des récepteurs ionotropiques glutamatergiques de type KA au niveau des neurones du système nerveux central et la mise en évidence de leurs effets excitateurs a conduit naturellement à rechercher leur rôle, particulièrement au niveau de la transmission synaptique excitatrice. Les premières tentatives pour révéler un courant post-synaptique excitateur porté par l'ouverture des récepteurs KA ( $EPSC_{KA}$ ) en utilisant les antagonistes sélectifs des récepteurs AMPA se révélèrent infructueuses au niveau de neurones hippocampiques en culture (Lerma et al., 1997). Cependant, un courant synaptique porté par l'activation de récepteurs KA fut pour la première fois enregistré au niveau des cellules





**Figure 28. Mise en évidence de réponses synaptiques dues à l'activation des récepteurs kainate dans les cellules pyramidales de la région CA3**

A. Dispositif expérimental. Stim: stimulation; Enreg: enregistrement.

B. Une simple stimulation (flèche) évoque une réponse complètement bloquée en présence d'un antagoniste des récepteurs AMPA (GYKI 53655).

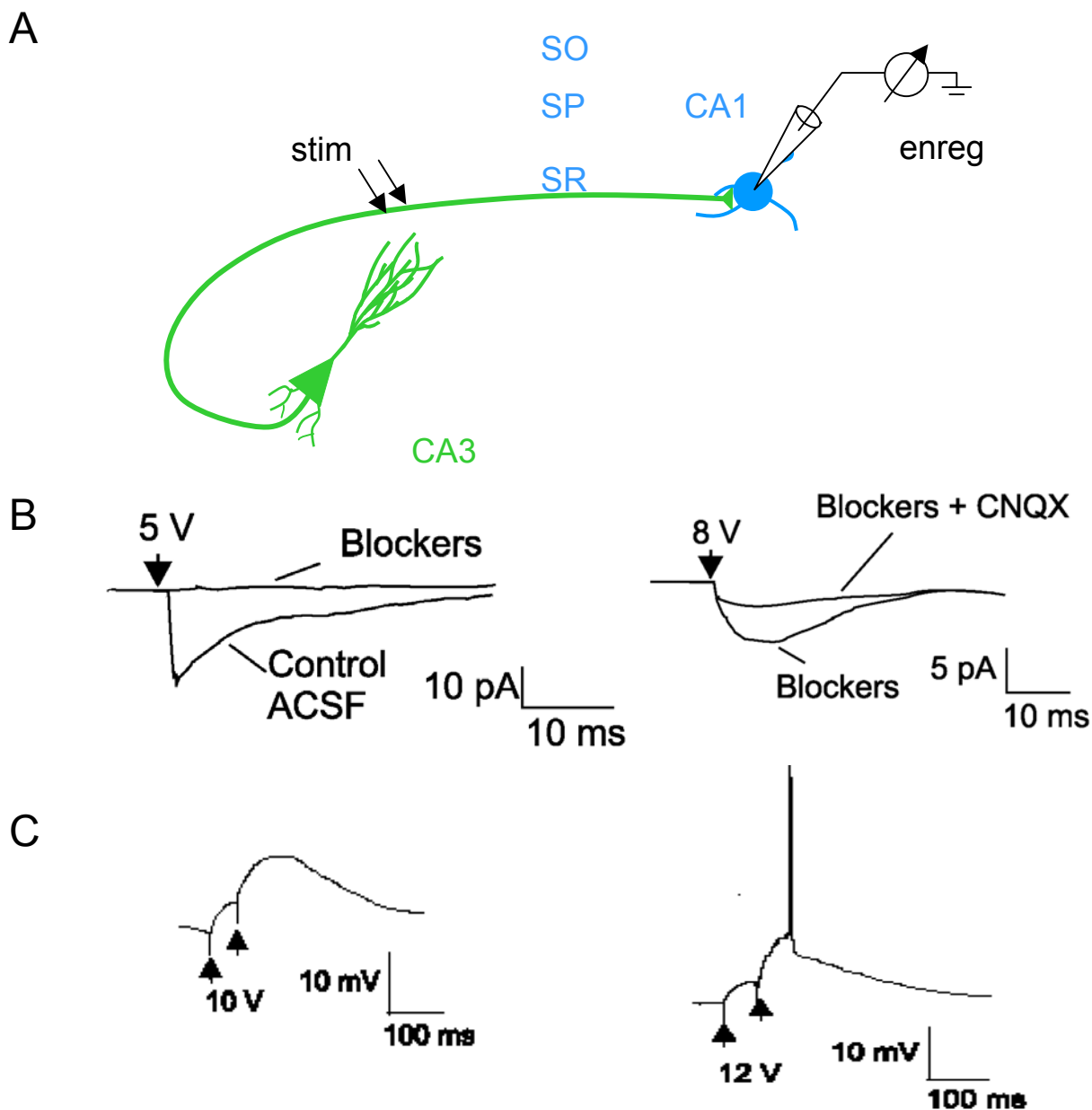
C. Des stimulations répétitives (5 chocs à 100 Hz) permettent de révéler une réponse même en présence de GYKI 53655. Cette réponse est bloquée par un antagoniste des récepteurs AMPA/KA le CNQX.

pyramidales de la région CA3 après stimulation répétée des axones des cellules granulaires : les fibres moussues (Vignes and Collingridge, 1997; Castillo et al., 1997b; Fig. 28). Ces EPSC<sub>KA</sub> furent isolés pharmacologiquement en présence d'antagonistes des récepteurs AMPA, NMDA et des récepteurs métabotropiques et bloqués par addition d'un antagoniste mixte des récepteurs AMPA/KA, le CNQX. Leur étude montra que les EPSC<sub>KA</sub> avaient une cinétique beaucoup plus lente et une amplitude beaucoup plus faible que les EPSC<sub>AMPA</sub> évoqués au niveau des mêmes synapses dans les mêmes cellules. Elle révéla également que, contrairement aux EPSC<sub>AMPA</sub>, les EPSC<sub>KA</sub> n'étaient observés qu'au niveau des synapses moussues mais pas au niveau des synapses formées par les fibres associatives commissurales. Cette observation est en accord avec les résultats des expériences d'autoradiographie après liaison de [3H]-KA qui montrent une forte liaison au niveau du stratum lucidum de la région CA3 (Monaghan and Cotman, 1982). Les EPSC<sub>KA</sub> évoqués à haute fréquence se somment et présentent la facilitation caractéristique des synapses moussues.

Contrairement aux cellules pyramidales de la région CA3, aucun EPSC<sub>KA</sub> n'a pu être évoqué au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 après stimulation des collatérales de Schaffer (Lerma et al., 1997; Bureau et al., 1999; Frerking et al., 1998), et des cellules granulaires du gyrus denté après stimulation des fibres de la voie perforante en provenance du cortex entorhinal (Lerma et al., 1997). Cependant, toutes les afférences glutamatergiques n'ont pas été testées au niveau de ces deux types cellulaires.

### III.6.3.2.2. Au niveau des interneurones

Des EPSC<sub>KA</sub> ont également pu être évoqués au niveau de différentes classes d'interneurones des *strata oriens* et *radiatum* de la région CA1 après une seule stimulation des axones des cellules pyramidales de CA3, les collatérales de Schaffer (Cossart et al., 1998; Frerking et al., 1998; Fig. 29). La caractérisation morphologique de ces cellules révéla que les EPSC<sub>KA</sub> étaient principalement évoqués au niveau des interneurones de type O-LM (voir chapitre I) et des cellules en panier (Cossart et al., 1998). Les EPSC<sub>KA</sub> enregistrés dans les interneurones ont les mêmes propriétés que ceux enregistrés dans les cellules pyramidales de la région CA3 à savoir une amplitude plus faible et une cinétique plus lente que les EPSC<sub>AMPA</sub> enregistrés dans les mêmes cellules. Ces différences cinétiques permettent de



**Figure 29. Mise en évidence de réponses synaptiques dues à l'activation des récepteurs kainate dans les interneurones de la région CA3**

- A. Dispositif expérimental. Stim: stimulation; Enreg: enregistrement.
- B. Une simple stimulation (flèche) évoque une réponse complètement bloquée en présence d'un antagoniste des récepteurs AMPA (GYKI 53655). Une augmentation de l'intensité de stimulation permet de révéler une réponse qui est bloquée en CNQX.
- C. Facilitation des EPSPKA et émission d'un potentiel d'action.

discriminer les réponses dues à l'activation des récepteurs AMPA de celles dues à l'activation des récepteurs KA en l'absence d'antagonistes. En effet, le courant évoqué dans ces conditions présente une composante rapide qui a la même cinétique que celle de l'EPSC<sub>AMPA</sub> et est bloquée par le GYKI et une composante lente qui a la même cinétique que l'EPSC<sub>KA</sub>, résiste au GYKI mais est bloqué par le CNQX (Frerking et al., 1998). L'étude de l'effet du GYKI sur ces deux composantes a confirmé qu'à forte concentration (100µM) celui-ci bloquait jusqu'à 50% du courant lent du à l'activation des récepteurs KA (Frerking et al., 1998). Ceci permet d'expliquer en partie pourquoi une augmentation de l'amplitude de stimulation est nécessaire à l'observation des EPSC<sub>KA</sub> dans les interneurons, de même que la nécessité de stimulations répétées au niveau des cellules pyramidales de la région CA3. La courbe I/V des EPSC<sub>KA</sub> est linéaire (Frerking et al., 1998) ou présente une légère rectification sortante (Cossart et al., 1998). Une analyse de ces événements en courant imposé révèle qu'après deux stimulations rapprochées dans le temps (intervalle de 50ms entre les stimulations) les EPSP<sub>KA</sub> facilitent et se somment (Cossart et al., 1998). Dans ces conditions, si la stimulation est suffisamment forte, le second EPSP<sub>KA</sub> peut générer un potentiel d'action. Si l'intensité de la stimulation est encore augmentée, les deux EPSP<sub>KA</sub> peuvent générer des potentiels d'action (Cossart et al., 1998). Ces événements présentent une dépression lorsqu'ils sont stimulés à haute fréquence (5 stimulations à 100 Hz; Frerking et al., 1998).

#### III.6.3.2.3. Composition en sous-unité des récepteurs kainate péri-, extra- et/ou post-synaptiques

Deux outils principaux ont été utilisés pour déterminer la composition en sous-unités des récepteurs KA post-synaptiques: des outils pharmacologiques et des souris transgéniques présentant des mutations spécifiques des gènes codant pour les sous-unités des récepteurs KA.

Au niveau des cellules pyramidales de la région CA3, l'amplitude des EPSC<sub>KA</sub> est réduite par trois antagonistes des récepteurs contenant la sous-unité GluR5 : le LY293558, le LY294486 et le LY382884 (Bortolotto et al., 1999; Vignes and Collingridge, 1997). Cependant, les travaux d'immunohistochimie montrent que la sous-unité GluR5 est peu exprimée dans les cellules pyramidales de la région CA3 et des travaux plus récents montrent que le LY382884 ne bloque que les récepteurs pré-synaptiques (Lauri et al., 2001a). L'étude de souris mutantes GluR6<sup>-/-</sup> montre les EPSC<sub>KA</sub> ne peuvent pas être évoqués au niveau des cellules pyramidales de la région CA3, même après stimulation à haute fréquence des fibres moussues (Mulle et al., 1998). Les études immunohistochimiques montrent un marquage des

sous-unités GluR6/GluR7 et KA2 au niveau des épines des fibres moussues. De plus, les EPSC<sub>KA</sub> évoqués au niveau des cellules pyramidales de la région CA3 de souris mutantes pour la sous-unité KA2, présentent des modifications de leur cinétique (Contractor et al., 2003) qui correspondent aux changements de cinétique observés entre récepteurs homomériques GluR6 et hétéromériques GluR6/KA2 dans les systèmes hétérologues (Swanson et al., 1996). L'ensemble de ces résultats, associé aux données récentes montrant que la sous-unité KA2 ne peut être exprimée au niveau synaptique qu'en formant des hétéromère avec la sous-unité GluR6 suggèrent que les récepteurs KA au niveau des synapses moussues sont des hétéromères formés des sous-unités GluR6 et KA2. L'application de KA au niveau des cellules pyramidales de la région CA3, à des concentrations inférieures à celles susceptibles d'activer les récepteurs AMPA (<3μM; Mulle et al., 1998), génère un courant dépolarisant chez les souris contrôles et GluR5<sup>-/-</sup> (Fisahn et al., 2004) mais pas GluR6<sup>-/-</sup> (Mulle et al., 1998).

Au niveau des cellules pyramidales de la région CA1, le courant évoqué par application d'une faible concentration de domoate, qui active spécifiquement les récepteurs KA, est bloqué chez les souris GluR6<sup>-/-</sup> (Bureau et al., 1999). Au niveau des interneurons de la région CA1, les EPSC<sub>KA</sub> évoqués par stimulation des collatérales de Schaffer dans le *stratum radiatum* sont bloqués par un antagoniste sélectif des récepteurs contenant la sous-unité GluR5 (Cossart et al., 1998). De plus des applications d'ATPA, à une concentration qui active spécifiquement les récepteurs KA contenant la sous-unité GluR5 exprimés dans les systèmes hétérologues (1μM; Paternain et al., 2000) induit un courant dépolarisant bloqué par le même antagoniste (Cossart et al., 1998). Des études utilisant des animaux transgéniques montrent cependant que les interneurons du *stratum radiatum* de la région CA1 de souris GluR5<sup>-/-</sup> sont sensibles à de faibles applications de KA, de même que les interneurons des *strata oriens* et *radiatum* de souris GluR6<sup>-/-</sup> (Bureau et al., 1999; Mulle et al., 2000). Seules les interneurons de souris GluR5<sup>-/-</sup> et GluR6<sup>-/-</sup> sont insensibles à ces applications. L'ensemble de ces études suggère que les récepteurs KA des interneurons de la région CA1 de l'hippocampe sont hétéromériques et formés des sous-unités GluR5 et GluR6 (Mulle et al., 2000). Une étude récente utilisant de façon combinée des antagonistes sélectifs des sous-unités des récepteurs KA et des souris mutantes GluR6<sup>-/-</sup> et GluR5<sup>-/-</sup> contredit cette hypothèse. D'après cette étude, les interneurons de la région CA1 seraient formés de récepteurs hétéromériques GluR6/KA2 qui sont sensibles à l'ATPA (à 10μM) (Christensen et al., 2004). Les contradictions entre ces résultats seraient dues à des phénomènes de compensation chez les mutants (Christensen et al., 2004). En effet, les études

pharmacologiques menées chez ces souris mutantes permettent de conclure que les souris GluR5<sup>-/-</sup> expriment des récepteurs homomériques GluR6 tandis que les souris GluR6<sup>-/-</sup> expriment des récepteurs homomériques GluR5. Ces changements d'expression seraient dus à une sous-régulation de la sous-unité KA2 chez ces souris (Christensen et al., 2004). Ces contradictions pourraient également être dues au fait que différents types d'interneurones expriment différentes sous-unités des récepteurs KA. Dans la région CA3, les interneurones du stratum radiatum de souris GluR6<sup>-/-</sup> sont insensibles à l'application de faibles concentrations de KA, à l'inverse la dépolarisation induite par le KA au niveau de ces interneurones chez les souris GluR5<sup>-/-</sup> est plus importante que chez les souris contrôle (Fisahn et al., 2004).

### III.6.3.3. Récepteurs kainate pré-synaptique

Une localisation présynaptique des récepteurs KA au niveau des fibres moussues a été suggérée dès les premières expériences de liaison de [<sup>3</sup>H]KA, montrant des sites à haute affinité dans le stratum lucidum de la région CA3. Cette hypothèse a été renforcée par des expériences réalisées au laboratoire montrant une disparition de ces sites à haute affinité après disparition des fibres moussues suite à la destruction des cellules granulaires par injection de colchicine et une préservation de ces sites après destruction des cellules pyramidales de la région CA3 par injection intra-amygdalienne de KA (Represa et al., 1987). Depuis, des récepteurs KA pré-synaptiques ont été identifiés au niveau de nombreuses synapses excitatrices et inhibitrices.

#### III.6.3.3.1. Récepteurs kainate pré-synaptiques au niveau des synapses excitatrices

##### III.6.3.3.1.1. Au niveau des fibres moussues

##### III.6.3.3.1.1.1. Plasticité synaptique à court terme

L'effet des récepteurs KA pré-synaptique au niveau des fibres moussues dépend de la concentration de KA utilisée. De très faibles concentrations de KA (20-50 nM) entraînent une augmentation de la libération de glutamate (Schmitz et al., 2001a; Schmitz et al., 2001b) tandis que de plus fortes concentrations (200-500nM) provoquent une diminution de la transmission synaptique excitatrice (Contractor et al., 2000; Kamiya and Ozawa, 2000; Schmitz et al., 2000). Ces effets peuvent être observés dans des conditions plus

physiologiques : ainsi la stimulation à faible fréquence des fibres moussues augmente l'amplitude des EPSC<sub>NMDA</sub> évoqués en présence de GYKI53655, tandis que la stimulation à plus forte fréquence la réduit (Schmitz et al., 2001b). Cette propriété classique des fibres moussues leur permet d'augmenter sensiblement l'amplitude de leur réponse synaptique en réponse à de faibles augmentations de la fréquence de stimulation (*frequency facilitation*) est réduite par des antagonistes des récepteurs KA contenant la sous unité GluR5 (Lauri et al., 2001b) et chez les souris mutantes GluR6<sup>-/-</sup> (Contractor et al., 2000; Lauri et al., 2001b). La *frequency facilitation* était jusqu'alors attribuée à une accumulation de calcium au niveau présynaptique (Salin et al., 1996). Elle est en partie due à une dépolarisation de l'extrémité pré-synaptique après activation de récepteurs KA pré-synaptiques (Lauri et al., 2001a; Schmitz et al., 2001b) qui entraînerait une augmentation du signal calcique dans les terminaisons moussues après chaque potentiel d'action (Kamiya et al., 2002). Les concentrations de KA permettant d'induire la *frequency facilitation* (50nM) sont bien inférieures à celles utilisées pour induire un courant au niveau des récepteurs post-synaptiques (Mulle et al., 1998) ce qui suggère la présence au niveau présynaptique de récepteurs ayant une plus grande affinité pour le KA. Ces résultats sont en accord avec la localisation de sites de liaison à haute affinité pour le KA au niveau des terminaisons moussues (Represa et al., 1987). Le fait que ces récepteurs soit à haute affinité permet au glutamate libéré par les collatérales de Schaffer d'augmenter la transmission synaptique au niveau des fibres moussues (facilitation hétérosynaptique ; Schmitz et al., 2001b). L'effet inhibiteur de concentrations plus élevées de KA pourrait être du à une inactivation des canaux sodiques et calciques voltage-dépendants suite à une forte dépolarisation (Kamiya and Ozawa, 2000; Schmitz et al., 2000; Schmitz et al., 2001a; Schmitz et al., 2001b). Cet effet inhibiteur peut également être induit par stimulation à haute fréquence des fibres associatives commissurales (dépression hétérosynaptique). Des récepteurs pré-synaptiques pourraient également être situés au niveau axonal car l'application de KA augmente la probabilité d'évoquer des potentiels d'actions antidromiques et l'amplitude de la volée afférente enregistrée en extracellulaire (Kamiya and Ozawa, 2000; Schmitz et al., 2000). De plus, les concentrations qui augmentent l'amplitude des EPSC<sub>NMDA</sub> sont sans effet sur la volée afférente. Ainsi l'effet sur la transmission synaptique et sur l'excitabilité axonale peuvent être dissociés. En effet, le KA à forte concentration augmente l'excitabilité axonale mais diminue la libération de glutamate (Kamiya and Ozawa, 2000). Les outils pharmacologiques ont montré que des agonistes des récepteurs GluR5 pouvaient diminuer la transmission synaptique au niveau des fibres moussues (Vignes et al., 1998). Ces résultats sont difficiles à réconcilier avec le fait que

les cellules granulaires expriment peu la sous-unité GluR5 (Bahn et al., 1994; Wisden and Seeburg, 1993a). Ces effets pourraient donc être non spécifiques. En effet, l'application d'ATPA induit un courant dépolarisant au niveau des interneurons associé à une forte augmentation de leur fréquence de décharge (Cossart et al., 1998; Frerking et al., 1998). Les grandes quantités de GABA libérées pourraient agir au niveau de récepteurs GABA<sub>B</sub> pré-synaptiques des fibres moussues et réduire de façon indirecte la libération de neurotransmetteurs. Les effets de l'ATPA sont en effet supprimés en présence d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>B</sub> (Schmitz et al., 2000). Cependant, les effets dépressifs du KA à forte concentration sont observés même en présence d'inhibiteur des récepteurs GABA<sub>B</sub> (Contractor et al., 2000; Schmitz et al., 2001b). L'utilisation de souris transgéniques montre que les effets inhibiteurs de fortes concentrations de KA sur la transmission synaptique moussue ne sont pas bloqués chez les souris GluR5<sup>-/-</sup> mais sont bloqués chez les souris GluR6<sup>-/-</sup> et GluR5<sup>-/-</sup>/GluR6<sup>-/-</sup> (Contractor et al., 2000). Une étude récente utilisant des souris mutantes pour la sous-unité KA2 montre que l'effet facilitateur au niveau homo- et hétéro-synaptique est altéré, mais que l'effet inhibiteur est préservé (Contractor et al., 2003). Ces résultats permettent de penser que les deux effets seraient dus à l'activation de récepteurs dont la composition en sous-unités serait différente.

#### III.6.3.3.1.1.2. Plasticité synaptique à long-terme

Comme nous l'avons vu, les récepteurs KA pré-synaptiques sont impliqués dans des mécanismes de plasticité à court terme de la transmission synaptique. Les récepteurs KA pré-synaptiques au niveau des fibres moussues seraient également impliqués dans les mécanismes de plasticité synaptique à long terme au niveau de cette synapse. En effet, l'induction de la plasticité à long terme est abolie par un antagoniste mixte des récepteurs AMPA et KA et par le LY382884, un antagoniste spécifique des récepteurs KA contenant la sous-unité GluR5 (Lauri et al., 2001a). Contrairement aux effets modulateurs des récepteurs KA pré-synaptiques observés au niveau de la plupart des synapses excitatrices de l'hippocampe, ces effets sur la plasticité synaptique à long terme seraient spécifiques de la synapse moussue. Des études utilisant les souris transgéniques contredisent ces résultats en montrant que les souris GluR5<sup>-/-</sup> ont une LTP normale au niveau des fibres moussues. Au contraire, la LTP moussue est diminuée mais pas abolie au niveau des souris GluR6<sup>-/-</sup>. La LTP résiduelle chez ces souris serait imputable à l'activation des récepteurs mGluR1 (Contractor et al., 2001). Des études plus poussées montrent que l'activation des récepteurs KA abaisse sensiblement le



seuil d'induction de cette plasticité à long terme. Ainsi, la LTP moussue peut être induite même en présence d'inhibiteurs des récepteurs KA mais cette induction requiert un plus grand nombre de stimulation (Schmitz et al., 2003). Les auteurs suggèrent également que la dépolarisation est responsable de l'effet des récepteurs KA car celui-ci peut être mimé en augmentant la concentration en potassium extracellulaire ce qui dépolarise les cellules (Schmitz et al., 2003).

#### III.6.3.3.1.2. Au niveau des autres synapses excitatrices de la formation hippocampique

L'application de KA à forte concentration (27 $\mu$ M) réduit la transmission synaptique entre les axones des cellules pyramidales de CA3, les collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales de la région CA1 (Chittajallu et al., 1996; Kamiya et al., 2002; Vignes et al., 1998). Malgré la forte concentration de KA utilisée, cet effet n'est pas dû à une hyperactivité des interneurones car l'effet est observé même en présence d'un inhibiteur des récepteurs GABA<sub>B</sub> (Chittajallu et al., 1996). L'effet est également observé en présence de hautes concentrations en calcium extracellulaire qui empêchent la décharge des interneurones (Frerking et al., 2001). L'application de KA (1 $\mu$ M) réduit l'augmentation de la concentration en calcium au niveau des terminaisons (Kamiya and Ozawa, 1998). Contrairement à l'effet du KA au niveau des fibres moussues, la diminution de la transmission synaptique induite par de faibles concentrations de domoate n'est pas due à une dépolarisation présynaptique car la fréquence des événements miniatures n'est pas augmentée (Frerking et al., 2001). Cet effet serait dû à l'activation d'une cascade de seconds messagers via les protéines G<sub>0</sub>/G<sub>i</sub> qui inhiberait les canaux calciques voltage dépendants (Frerking et al., 2001) comme ce qui a été observé au niveau de la transmission synaptique inhibitrice (Rodriguez-Moreno and Lerma, 1998). Cette effet est bloqué par un antagoniste de récepteurs kainate contenant la sous-unité GluR5 (Vignes et al., 1998).

L'application de KA (3  $\mu$ M) réduit la transmission synaptique au niveau des synapses formées par les fibres associatives/commissurales sur les cellules pyramidales de la région CA3 (Bortolotto et al., 1999; Contractor et al., 2000). Cet effet n'est pas observé chez les souris GluR6<sup>-/-</sup> mais n'est pas modifié chez les souris GluR5<sup>-/-</sup> (Contractor et al., 2000). Au niveau des synapses formées par les fibres de la voie perforante, l'application de KA entraîne une augmentation de la transmission synaptique excitatrice (Contractor et al., 2000). Cet effet serait dû à l'activation de récepteurs KA hétéromériques contenant les sous-unités GluR5/GluR6 (Contractor et al., 2000).

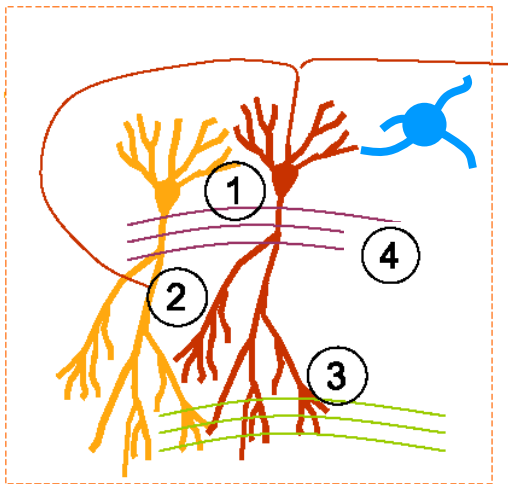
L'ensemble de ces travaux montre que les récepteurs KA ont un effet modulateur au niveau de toutes les synapses excitatrices examinées à ce jour dans la formation hippocampique.

#### III.6.3.3.2. Récepteurs kainate pré-synaptiques au niveau des synapses inhibitrices

En plus de leur effet neuromodulateur au niveau de la transmission synaptique excitatrice, les récepteurs KA présynaptique modulent également la transmission synaptique inhibitrice. En effet, les premières études avaient montré que de faibles doses de KA (0.3-1  $\mu$ M) diminuent l'amplitude des événements synaptiques inhibiteurs spontanés enregistrés au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 et CA3 (Fisher and Alger, 1984; Kehl et al., 1984; Sloviter and Damiano, 1981). Aujourd'hui, de nombreuses études rapportent une diminution pré-synaptique de la libération de GABA au niveau des cellules principales suite à l'activation de récepteurs pré-synaptiques (mais voir (Mulle et al., 2000). Des études plus récentes rapportent une augmentation de la libération de GABA sur les interneurons également liée à l'activation de récepteurs KA pré-synaptiques (Cossart et al., 2001b; Jiang et al., 2001).

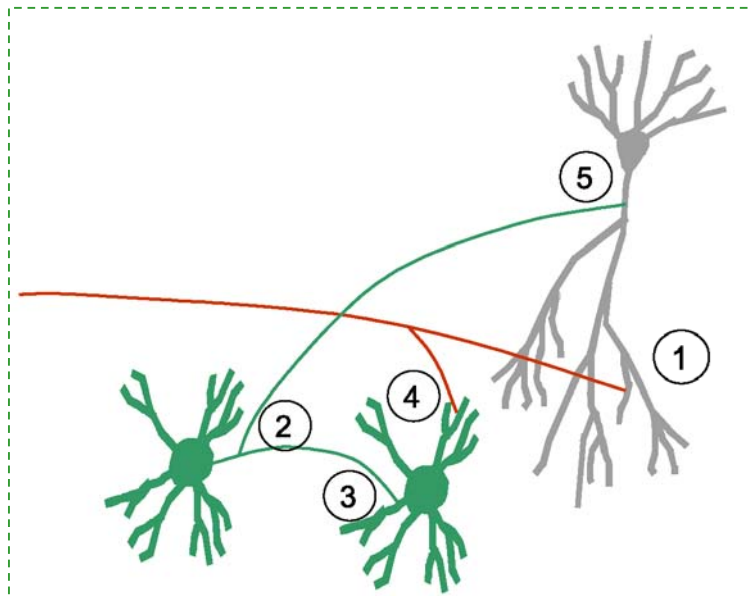
L'effet du KA sur la transmission synaptique inhibitrice au niveau des cellules principales de la région CA1 a été attribuée à l'activation de récepteurs KA pré-synaptiques (Clarke et al., 1997). En effet, l'application de KA en présence d'inhibiteurs spécifiques des récepteurs AMPA, induit une diminution des échecs de la transmission synaptique, du coefficient de variance et diminue de façon équivalente les composantes rapide (liée à l'activation de récepteurs GABA<sub>A</sub>) et lente (liée à l'activation de récepteurs GABA<sub>B</sub>) de la transmission synaptique inhibitrice (Rodriguez-Moreno et al., 1997). La diminution serait liée à l'activation de cascades de seconds messagers via des récepteurs KA ayant une action métabotrope. Des travaux plus récents montrent que les récepteurs KA pré-synaptiques pourraient être situés au niveau axonal, car en présence de faibles concentrations de KA (0.25-1  $\mu$ M) la probabilité d'évoquer un potentiel d'action antidromique est augmentée dans les interneurons. D'autres études soutiennent au contraire que l'effet inhibiteur de fortes concentrations de KA (10  $\mu$ M) sur la transmission synaptique inhibitrice serait dû à un effet post-synaptique sur les interneurons via l'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> (Frerking et al., 1999). Cependant, des concentrations d'agonistes n'induisant pas de courant post-synaptique au niveau des interneurons peuvent inhiber la transmission synaptique inhibitrice et des agonistes qui provoquent une forte augmentation de la fréquence de décharge des

## Cellules Pyramidales et interneurones de CA3



- ① Fibres moussues:  
Pré: GluR6,KA1,KA2  
Post: GluR6,KA2
- ② Voie A/C:  
Pré: GluR6  
Post: non
- ③ Voie perforante:  
Pré: GluR5,GluR6  
Post: non
- ④ Axonal : oui

## Cellules Pyramidales et interneurones CA1



- ① Coll Schaffer:  
Pré: GluR5  
Post: non
- ② Axonal: oui
- ③ Int-int:  
Pré:GluR6
- ④ Coll Schaffer-int:  
Pré: ?  
Post: GluR5
- ⑤ Int-pyramidale CA1:  
Pré: GluR5/GluR6

### Somato-dendritique:

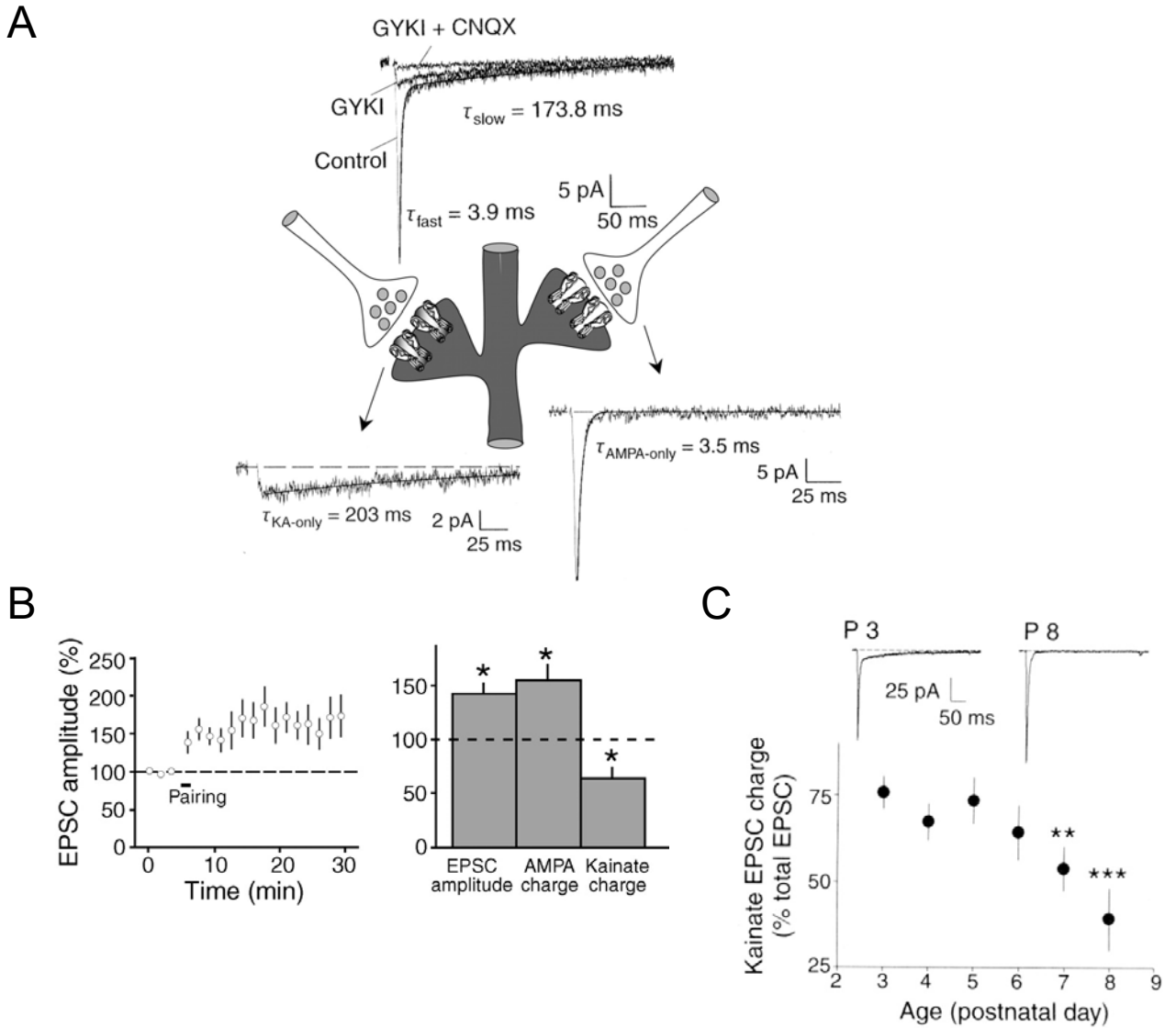
- GluR6
- GluR6
- GluR5/GluR6 ou GluR6/KA2
- GluR6

**Figure 30. Récepteurs kainate dans la formation hippocampique**

interneurones (comme l'AMPA 50 $\mu$ M) restent sans effet sur la transmission synaptique GABAergique (Rodriguez-Moreno et al., 2000). Certains effets attribués aux récepteurs KA pré-synaptiques pourraient également être dus à l'activation de ces récepteurs axonaux (Semyanov and Kullmann, 2001).

Au-delà des mécanismes impliqués, il est important de noter que la régulation de la transmission synaptique inhibitrice par les récepteurs KA est différente selon les concentrations d'agoniste utilisées. En réalisant des paires connectées entre interneurones et cellules pyramidales Jian et al. (2001) montrent que le KA à faible concentration (300 nM) diminue les échecs de la transmission synaptique au niveau de synapses ayant une faible probabilité de libération (PI) et n'ont pas d'effet au niveau des synapses ayant déjà une grande probabilité de libération (Ph). A forte concentration (5 $\mu$ M) le KA a un effet biphasique au niveau des connexions PI avec une première phase de diminution du nombre d'échecs suivie par une seconde phase d'augmentation du nombre d'échec associée à une diminution de l'amplitude. Au niveau des synapses Ph, le KA diminue à la fois la probabilité de libération et l'amplitude des événements synaptiques. De plus cette étude montre que la haute probabilité de libération au niveau des synapses Ph pourrait être due à l'activation constitutive de récepteurs KA car le GYKI 53655 et le SYM 2206 ne modifient pas la probabilité de libération au niveau de ces synapses tandis que le CNQX la diminue significativement. Les effets facilitateurs de faibles concentrations de KA ne sont pas dus à l'activation de protéines kinases. Différentes familles d'interneurones forment des synapses inhibitrices ayant différentes probabilités de libération au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 (Pawelzik et al., 2002; Thomson et al., 2000; Pawelzik et al., 1999). L'étude de Jian et al suggère que les récepteurs KA pré-synaptique pourraient différemment réguler la libération de neurotransmetteurs au niveau de ces différents types de synapses (voir aussi Cossart et al., 2001b).

Les synapses inhibitrices sur les interneurones sont elles aussi modulées par des récepteurs KA pré-synaptiques. L'activation des récepteurs pré-synaptiques par de faibles concentrations de KA (250 nM) induit une augmentation de la fréquence des événements miniature et réduit le nombre d'échec de la transmission synaptique au niveau de tous les interneurones testés (Clarke et al., 1997; Cossart et al., 2001b). Cet effet est observé chez des souris mutantes GluR5  $-/-$  mais pas chez les souris mutantes GluR6  $-/-$  (Mulle et al., 2000). L'effet au niveau des synapses inhibitrices sur les cellules pyramidales est beaucoup plus hétérogène, en accord avec les travaux de Jian et al., avec des augmentations (2/8), des



**Figure 31. Mise en évidence de réponses synaptiques dues à l'activation des récepteurs kainate au niveau des synapses thalamocorticales chez le jeune**

A. La stimulation des synapses thalamocorticales chez le jeune génère un évènements synaptique ayant une cinétique double. La composante rapide est due à l'activation des récepteurs AMPA car elle est bloquée en GYKI 53655. La composante lente est due à l'activation des récepteurs kainate car elle est résistante au GYKI mais bloquée par le CNQX. Les récepteurs AMPA et KA sont localisés au niveau de synapses différentes car des EPSC<sub>AMPA</sub> et des EPSC<sub>KA</sub> spontanés peuvent être enregistrés.

B. Régulation différentielle des composantes AMPA et KA de l'EPSC double par un protocole de potentialisation synaptique.

C. Régulation différentielle des composantes AMPA et KA de l'EPSC double lors du développement.

diminutions (2/8) ou aucun changement (4/8) sur la transmission synaptique (Cossart et al., 2001b).

En conclusion, les récepteurs KA sont très largement distribués aux niveaux pré- et post-synaptique où ils interviennent dans la transmission synaptique et sa modulation (Fig. 30).

#### III.6.4. Etude des récepteurs kainate natifs dans d'autres régions du système nerveux

##### III.6.4.1. Au niveau du cortex

Les études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie révèlent la présence de récepteurs KA au niveau cortical essentiellement au niveau de couche II et VI mais également au niveau du cortex entorhinal et cingulaire (Bahn et al., 1994; Wisden and Seeburg, 1993a). Des EPSC ayant une composante lente KA en plus de la composante rapide AMPA ont cependant pu être évoqués dans les cellules de la couche IV du cortex après stimulation de la voie thalamo-corticale pendant la première semaine de vie postnatale (Kidd and Isaac, 1999). Comme au niveau des cellules principales et des interneurons de l'hippocampe, la composante lente a une amplitude plus faible que la composante rapide (Fig. 31). Les études des courbes I/V révèlent une rectification pour la composante lente alors que la composante rapide est linéaire (voir chapitre II). Ces travaux montrent également que des événements KA isolés, sans la composante AMPA, peuvent être évoqués (Kidd and Isaac, 1999). Ainsi, les auteurs distinguent des synapses qui activent uniquement les récepteurs KA et des synapses qui activent uniquement des récepteurs AMPA. Pour savoir si, au niveau de certaines synapses, les récepteurs AMPA et KA sont colocalisés, Kidd et Isaac étudient les événements glutamatergiques spontanés en présence d'inhibiteurs des récepteurs GABA<sub>A</sub> et NMDA. Cette étude montre qu'au niveau de ces cellules les événements synaptiques glutamatergiques non-NMDA sont soit rapides et dus à l'activation des récepteurs AMPA, soit lents et dus à l'activation des récepteurs KA. Enfin cette étude montre que la part relative des composantes AMPA et KA au niveau des événements mixtes AMPA/KA évoqués diminue au cours du développement : à P3 (3 jours post-natal), la composante KA du fait de sa cinétique lente représente 75 % de la charge portée par l'événement mixte AMPA/KA tandis qu'à P8 elle n'en représente que 40% (Fig. 31C). Enfin les auteurs montrent que cette régulation pourrait être un phénomène dépendant de l'activité car l'induction de phénomènes de plasticité à long terme entraîne une diminution de la composante KA des EPSCmixte. Ces expériences

montrent qu'au niveau des cellules de la couche IV du cortex sensoriel, la participation des récepteurs KA à la transmission synaptique est restreinte à la première semaine de vie post-natale (Kidd and Isaac, 1999).

Un effet neuromodulateur de l'activation des récepteurs KA a également été décrit dans le cortex au niveau de synapses formées par des interneurons sur les cellules de la couche V du cortex. Au niveau de ces synapses, enregistrée grâce à des enregistrements en paire interneurone-pyramide, l'activation spécifique des récepteurs KA, par l'ATPA (1 $\mu$ M) ou le glutamate (10  $\mu$ M) en présence de GYKI 53655 induit une diminution de la transmission synaptique. Des changements du nombre d'échecs de la transmission synaptique et du coefficient de variation pointent une origine pré-synaptique de la modulation. Cet effet n'est pas observé en présence d'un inhibiteur mixte des récepteurs AMPA et KA, le CNQX (50 $\mu$ M). Un effet comparable est observé dans les mêmes conditions après une dépolarisation prolongée de la cellule post-synaptique. Selon les auteurs, cet effet pourrait être dû à une libération dendritique de glutamate venant activer des récepteurs KA pré-synaptique (Ali et al., 1998).

#### III.6.4.2. Au niveau de l'amygdale

Des injections intra-amygdaliennes de KA induisent des crises d'épilepsie temporale. Li et ses collègues, ont recherché si les récepteurs KA présents dans l'amygdale participaient à la transmission synaptique glutamatergique (Li and Rogawski, 1998). Ces auteurs se sont intéressés à l'amygdale dorso-latérale qui contient des neurones excitateurs. La stimulation d'afférences excitatrices en provenance de la capsule externe génère un courant en présence de GYKI 52466 et bloqué en présence de CNQX. Comme dans l'hippocampe, la transmission synaptique due à l'activation des récepteurs KA est spécifique de certaines afférences car la stimulation des afférences intra-amygdaliennes génère un courant entièrement bloqué par les antagonistes des récepteurs AMPA. Les événements synaptiques dus à l'activation des récepteurs KA se somment en réponse à un train de stimulation à haute fréquence (50Hz).

Le même groupe a également montré que dans cette structure, les récepteurs KA étaient impliqués dans une forme de plasticité induite par des stimulations prolongée et à faible fréquence (1Hz). Cette forme de plasticité est en effet bloquée en présence d'antagoniste des récepteurs KA contenant la sous-unité GluR5 (LY377770 et LY382884) mais pas par des antagonistes des récepteurs AMPA, NMDA et des récepteurs métabotropiques. Elle peut également être induite par un agoniste des récepteurs KA, l'ATPA

(20 $\mu$ M). Cette forme de plasticité affecte les réponses synaptiques AMPA et NMDA suggérant un site d'expression pré-synaptique. De plus elle peut également affecter d'autres synapses que celles stimulées (Li et al., 2001). Récemment, les récepteurs KA pré-synaptiques ont également été impliqués dans la régulation de la transmission synaptique inhibitrice dans l'amygdale. A ce niveau, la régulation de la transmission synaptique inhibitrice dépend de la concentration en agoniste : tandis que de faibles concentrations d'agonistes l'augmentent, de plus fortes concentrations la réduisent. Cet effet est également observé au niveau de la transmission synaptique inhibitrice miniature. Ces travaux suggèrent également que l'activation des récepteurs KA par le glutamate endogène pourrait constitutivement augmenter la transmission synaptique inhibitrice (Braga et al., 2003).

#### III.6.4.3. Au niveau de la rétine

Au niveau de la rétine, Devries et Schwartz montrent que les récepteurs KA participent à la transmission synaptique entre les photorécepteurs de type cône et les cellules bipolaires de type « off » (DeVries and Schwartz, 1999). Les auteurs utilisent des enregistrements de paires de neurones connectés cône-cellule bipolaire « off » pour montrer que la dépolarisation du cône de -70 à 0 mV induit un courant biphasique dans la cellule bipolaire « off » avec une composante de grande amplitude se désensibilisant rapidement (5ms) et une composante non désensibilisée (5% de la réponse totale). Ces deux composantes sont portées par l'activation des récepteurs KA car elles ne sont pas affectées par des antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA mais sont complètement bloquées par le CNQX. Des courants ayant les mêmes propriétés de désensibilisation sont également observées lorsque du glutamate est directement appliqué sur les cellules bipolaires off. Dans le noir, les photorécepteurs sont dépolarisés et libèrent en permanence du glutamate. La capacité des récepteurs KA à se désensibiliser rapidement permettrait de ne pas activer en permanence les cellules bipolaires « off ». La lumière induit une hyperpolarisation des photorécepteurs et une réduction de la libération de neurotransmetteurs. Les récepteurs KA peuvent se re-sensibiliser. Lorsque la lumière disparaît de nouveau, la libération de glutamate produit cette fois un courant qui est d'autant plus important que la durée d'exposition à la lumière (et donc le temps de re-sensibilisation) a été longue. Les auteurs montrent cependant que même les courants de faibles amplitudes, évoqués par l'obscurité après une courte période de luminosité lorsque la plupart des récepteurs sont encore désensibilisés, sont suffisamment importants pour faire décharger la cellule bipolaire « off ».



#### III.6.4.4. Au niveau du striatum

Avec la régions CA3 de l'hippocampe, le striatum est l'une des régions qui présente le plus fort marquage par utilisation de  $[3H]KA$  et qui exprime le plus fortement les sous-unités des récepteurs KA. La plupart des cellules de projection expriment la sous-unité GluR6 (Chergui et al., 2000). Des travaux anciens rapportent l'induction d'un courant post-synaptique par application de faibles concentrations de KA (qui activent spécifiquement les récepteurs KA). Des travaux plus récents utilisant des antagonistes sélectifs des récepteurs AMPA et des souris mutantes pour la sous-unité GluR6 confirment la présence de récepteurs KA extrasynaptiques au niveau des neurones de projection du striatum dorsal mais aucun EPSC<sub>KA</sub> n'a pu être évoqué. Dans cette structure, le KA module également la libération de GABA mais par une action indirecte sur des récepteurs adrénergique de type A2A (Chergui et al., 2000).

Au niveau du striatum ventral et du noyau accumbens, la plupart des neurones expriment des récepteurs KAs extrasynaptiques contenant la sous-unité GluR6 mais aucune preuve de la présence de récepteurs KA post-synaptiques n'a pu être apportée (Casassus and Mulle, 2002; Crowder and Weiner, 2002). Au niveau du noyau accumbens, l'application de faibles doses de KA permet de réduire la transmission synaptique excitatrice même en présence d'antagonistes des récepteurs AMPA, métabotropiques glutamatergiques et GABAergiques. L'effet est présynaptique car il implique un changement du coefficient de variance  $1/CV^2$  (Casassus and Mulle, 2002) et une augmentation de la paired-pulse facilitation (Crowder and Weiner, 2002). L'examen de souris mutantes révèle que cette modulation disparaît uniquement chez les souris doubles mutantes GluR6-/-XGluR5-/- (Casassus and Mulle, 2002).

#### III.6.4.5. Au niveau de l'hypothalamus

Dans l'hypothalamus, l'application de KA entraîne une augmentation de la fréquence des IPSCs spontanés. Les auteurs ont également observé une augmentation de la fréquence des événements miniatures après application de KA à forte concentration (10 $\mu$ M). Ces résultats suggèrent que l'augmentation des IPSCs pourrait avoir une double composante pré- et post-synaptique (Liu et al., 1999).

#### III.6.4.6. Au niveau du cervelet

Le cervelet exprime principalement les sous-unités GluR5, GluR6 et KA2 et plus faiblement la sous-unité KA1 (Bahn et al., 1994). Comme dans l'hippocampe, ces sous-unités ne sont pas toutes exprimées dans tous les types cellulaires. Ainsi, les cellules de Purkinje expriment principalement la sous-unité GluR5 et plus faiblement la sous-unité KA1, les cellules granulaires expriment fortement les sous-unités GluR6 et KA2 mais pas la sous-unité GluR5 et les cellules en panier expriment principalement la sous-unité GluR7 (Wisden and Seeburg, 1993a; Bahn et al., 1994). L'EPSC évoqué au niveau des cellules de Golgi (interneurones situé dans la couche des cellules granulaire) après stimulation des fibres parallèles ont une composante GYKI 53655 (50 $\mu$ M) résistante bloquée par le CNQX. Comme la plupart des EPSC<sub>KA</sub> décrits, cette composante a une cinétique lente et une amplitude faible. La composante lente due à l'activation des récepteurs KA se somme à haute fréquence de stimulation jusqu'à atteindre le seuil de décharge d'un potentiel d'action. Elle disparaît chez les souris GluR6-/- (Bureau et al., 2000).

Les récepteurs KA sont aussi impliqués dans la modulation de la transmission synaptique excitatrice entre les cellules granulaires et les cellules de Purkinje d'une part et les cellules inhibitrices en panier d'autre part. Dans les deux cas l'activation des récepteurs KA par de faibles concentrations d'agonistes (domoate 5nM) ou de faibles fréquences de stimulation (10-20 Hz) entraîne une augmentation de la transmission synaptique excitatrice. Cependant, à de plus fortes concentrations d'agoniste (domoate 50 nM) ou de plus hautes fréquences de stimulation (30 Hz) la transmission synaptique au niveau des cellules en panier est réduite alors que celle au niveau des cellules de Purkinje est toujours augmentée. Ce mécanisme introduit une modulation supplémentaire dans l'excitation globale des cellules de Purkinje en fonction de la fréquence d'activation des fibres parallèles (Delaney and Jahr, 2002).

#### III.6.4.7. Au niveau de la moëlle épinière

Les travaux de Li et al., (1999), ont permis de caractériser les réponses synaptiques glutamatergiques recues par les neurones de la couche II de la corne dorsale de la moelle suite à la stimulation des fibres afférentes sensorielles à haut et bas seuil d'activation. Ces auteurs montrent qu'à des intensités suffisamment élevées pour activer les fibres à haut seuil (nociceptives et thermoceptives) les stimulations génèrent une réponse glutamatergique ayant

une composante KA alors que la stimulation des fibres sensorielles à bas seuil ne génère que des réponses dues à l'activation des récepteurs AMPA. Contrairement aux synapses KA caractérisées dans l'hippocampe, les réponses KA présentent une dépression après stimulation à haute fréquence sans doute due à la désensibilisation des récepteurs car la dépression est moins grande en présence de concanavaline A (Li et al., 1999).

Des travaux plus récents montre que la fréquence des événements miniature KA peut être augmentée par application de KA (10 $\mu$ M). Cependant, les auteurs observent que l'effet de l'application de KA est globalement négatif sur la transmission synaptique inhibitrice, un effet du à l'activation indirecte de récepteurs GABA<sub>B</sub> par le GABA libéré. Des effets identiques furent observés en tranche après stimulation des fibres afférentes primaires glutamatergiques (Kerchner et al., 2001a).

#### III.6.4.8. Au niveau des ganglions dorsaux de la moëlle

Les premiers récepteurs KA fonctionnels décrits au niveau du système nerveux ont été caractérisés sur les axones des fibres C des nerfs périphériques (Davies et al., 1979; Agrawal and Evans, 1986). L'activation de ces fibres par le KA mais pas par d'autre agonistes des récepteurs glutamatergiques a contribué à faire émerger l'idée qu'il existait des récepteurs KA différents des récepteurs AMPA et NMDA. Des études en patch clamp sur les neurones isolés de la moelle ont confirmé l'existence de récepteurs spécifiquement activés par le KA au niveau des neurones de petit diamètre qui donnent naissances aux fibres C (Lee et al., 2001). L'activation de ces récepteurs par le KA (10 $\mu$ M) ou l'ATPA (2 $\mu$ M) entraîne une diminution de la transmission synaptique glutamatergique entre les fibres C et les neurones de la corne dorsale de la moëlle (Kerchner et al., 2001b). Ces récepteurs seraient formés des sous-unités GluR5 et GluR6 (Kerchner et al., 2002).

Chapitre IV :  
Récepteurs kainate et épilepsie du lobe temporal

L'épilepsie est une des principales maladie neurologique. Elle touche en moyenne 1% de la population (Engel et al., 1997). Cette maladie se caractérise par des crises qui correspondent sur le plan électroencéphalographique à une hypersynchronie à haute fréquence de l'activité neuronale. Sur le plan clinique, les signes divergent si la crise est focale (l'hypersynchronie reste localisée dans une région cérébrale) ou généralisée (l'hypersynchronie embrase l'ensemble des hémisphères cérébraux). Les signes associés aux crises focales dépendent du rôle de la région cérébrale touchée par la crise. Les crises sans perte de conscience sont dites « partielles simples » tandis que celles associées à une perte de conscience sont dites « partielles complexes ». Les crises généralisées s'expriment par des mouvements généralisés des membres supérieurs et/ou inférieurs. Ces mouvements peuvent être des contractions prolongées (mouvements toniques) ou des oscillations rapides entre contraction et relaxation (mouvements cloniques). On distingue de très nombreux « types » de crises selon qu'il y ait ou non perte de conscience, que la crise soit ou non associée à des mouvement et selon la nature de ces mouvements (mouvements toniques, mouvements cloniques, mouvements tonico-cloniques). Les crises généralisées peuvent correspondre à une généralisation immédiate de l'activité paroxystique (généralisation primaire) ou à la généralisation d'une crise focale (généralisation secondaire). Les épilepsies sont également classées en fonction de la cause de l'épilepsie. Ainsi, les épilepsies peuvent être symptomatiques (épilepsies dont la cause peut être déterminée) ou idiopathiques (épilepsies dont la cause directe est difficile à déterminer qui peuvent être d'origine génétique). Ces schémas de classification simples ne permettent cependant pas de rendre compte de la diversité des formes d'épilepsie et souvent les classifications sont beaucoup plus complexes (Karlov, 2003; Gastaut, 1969).

Dans ce chapitre nous allons nous intéresser à un type d'épilepsie en particulier : les épilepsies du lobe temporal. Les épilepsies du lobe temporal sont les plus fréquentes chez l'adulte et sont pharmacorésistantes. Nous allons voir comment l'utilisation du KA a permis de mettre au point les premiers modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal et dans quelle mesure ces modèles ont permis une meilleure connaissance de ces épilepsies.

## IV.1. Les épilepsies du lobe temporal

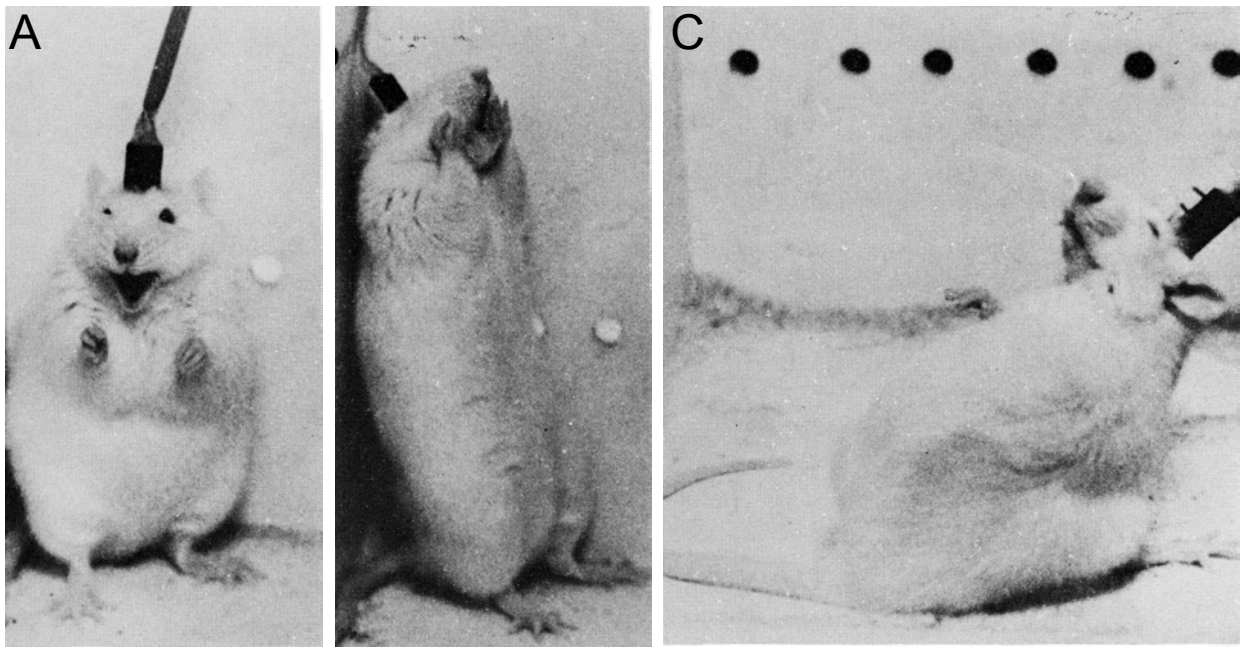
### IV.1.1. Signes cliniques et activités électriques

Les épilepsies du lobe temporal (TLE pour *Temporal Lobe Epilepsy*) représentent 30-40% des épilepsies adultes. Ces épilepsies sont souvent pharmacorésistantes et la chirurgie est l'une des principales solutions thérapeutiques (Engel, Jr. et al., 1978; Engel, Jr., 2001). Les patients atteints d'épilepsie du lobe temporal ont souvent subi des crises fébriles, des traumatismes cérébraux ou des infections intracérébrales dans leur enfance (Mathern et al., 1995b). Les crises d'épilepsie du lobe temporal, initialement décrites par Jackson (1888), sont de type partielles-complexes. Elles commencent par un ensemble de sensations, appelées « auras » qui peuvent être visuelles, olfactives, gustatives ou plus intégrées (hallucinations, impression de déjà vu). Elles sont associées à des réactions viscérales (mastications, salivation). Les structures du lobe temporal sont principalement impliquées dans ce type d'épilepsie. Les manifestations cliniques sont associées à des décharges paroxystiques dans les régions temporales et la résection d'une partie du lobe temporal permet de stopper les crises (Engel et al., 1997). Des activités anormales à haute fréquence de type interictales (*fast ripples*) sont souvent enregistrées dans la région hippocampique et au niveau du cortex entorhinal (Bragin et al., 1999; Staba et al., 2002). Les décharges pendant les crises sont observées dans la partie mésiale du lobe temporal (Engel, Jr. et al., 1989; Spencer et al., 1992). Elles impliquent l'hippocampe et d'autres structures du lobe temporal telles que l'amygdale et le cortex entorhinal (Bartolomei et al., 2004; Velasco et al., 2000). Récemment, des travaux ont montré que les activités interictales enregistrées dans la région hippocampique sont générées au niveau du subiculum mais pas au niveau de la formation hippocampique (Cohen et al., 2002; Cohen et al., 2003).

### IV.1.2. Sclérose hippocampique

La majorité des épilepsies du lobe temporal (50-70%) est associée à un patron caractéristique de mort neuronale et de remaniements axonaux au niveau de l'hippocampe appelé «*sclérose hippocampique*» (Mathern et al., 2002). La sclérose hippocampique est souvent associée aux épilepsies du lobe temporal dites mésiales. Après son observation initiale par Bouchet et Cazauviehl en 1825, la sclérose hippocampique a été décrite en détail et largement étudiée depuis (Babb et al., 1984; Kim et al., 1990; Mathern et al., 1997). Les

travaux de Margerisson et Corsellis (Margerison and Corsellis, 1966) et Sano et Malamud (Sano and Malamud, 1953) permettent d'établir une bonne corrélation entre les manifestations cliniques des crises, les enregistrements électrophysiologiques et le degré de sclérose hippocampique. La sclérose hippocampique est caractérisée par la perte de cellules pyramidales dans les régions CA1 et CA3 et la perte de nombreux neurones dans le hilus principalement des cellules moussues (Mathern et al., 1995c; El Bahh et al., 1999; Loup et al., 2000; Blumcke et al., 2000). Le gyrus denté est généralement préservé. Des travaux plus récents montrent que certains types d'interneurones inhibiteurs sont également affectés dans la sclérose hippocampique chez l'homme notamment ceux exprimant la somatostatine et la parvalbumine (de Lanerolle et al., 1989; Robbins et al., 1991; Mathern et al., 1995a; Magloczky et al., 2000; Wittner et al., 2001) pour revue voir (Magloczky and Freund, 2005). Le patron de mort neuronale s'accompagne d'une plasticité réactive des fibres moussues qui bourgeonnent dans la couche moléculaire interne (Babb et al., 1991; de Lanerolle et al., 1989; Houser et al., 1990; Isokawa et al., 1993; Represa et al., 1989; Sutula et al., 1989) où elles contactent les cellules granulaires en formant des boutons géants moussus caractéristiques (Babb et al., 1991; Franck et al., 1995; Zhang and Houser, 1999). Le bourgeonnement des fibres moussues a été interprété comme un phénomène compensatoire à la perte d'afférences glutamatergiques dans la couche moléculaire interne suite à la dégénérescence des cellules moussues (pour revue voir Nadler, 2003). Des études récentes suggèrent également la possibilité d'un bourgeonnement axonal des interneurones contenant le calrétinine chez l'homme (Magloczky et al., 2000). La sclérose hippocampique est un facteur aggravant de l'épilepsie du lobe temporal. Une étude réalisée auprès d'un échantillon important de patients montre que le diagnostic de sclérose hippocampique est associé au pire pronostic de possibilité de traitement médicamenteux de l'épilepsie (Semah et al., 1998). D'autres travaux à partir de tranches d'hippocampes de patients atteints d'épilepsie du lobe temporal montrent que la sclérose hippocampique est corrélée avec la sévérité des patrons d'activités épileptiformes évoqués dans le gyrus denté (Gabriel et al., 2004). Ainsi, seuls des événements de types « interictale » ou « dépression propagée » peuvent être évoqués par stimulation dans les tranches d'hippocampe non sclérotiques. Au contraire, des événements de type « ictale » et « crise » peuvent être évoqués dans les mêmes conditions au niveau des tranches d'hippocampe sclérotique (Gabriel et al., 2004).



**Figure 32. Exemple de crises induites par injection intra-amygdalienne de kainate**

- A. Redressement avec myoclonie des membres supérieurs et faciale (Stade IV, Racine 1972).
- B. Redressement plus prononcé et tremblement des membres supérieurs.
- C. Chute sur le coté après redressement (Stade V, Racine 1972).
- D. Effets électrographiques et moteurs après injection intra-amygdalienne de kainate.

D'après Ben-Ari et al., 1979 (D) et 1980 (A, B et C)



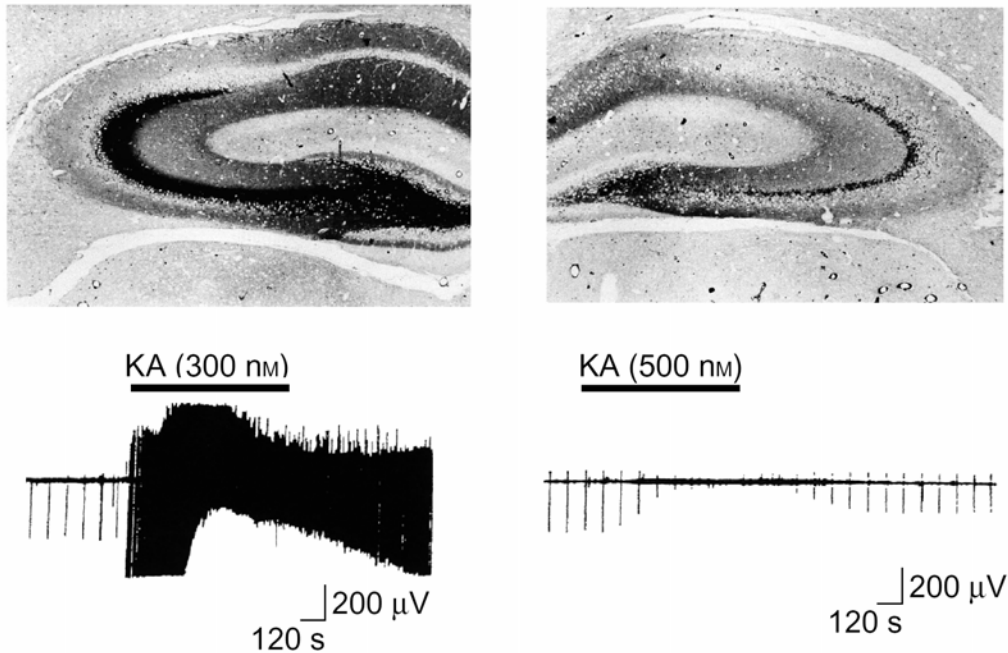
## IV.2. Récepteurs kainate et épilepsie du lobe temporal

Le premier lien entre le KA et l'épilepsie du lobe temporal est l'observation qu'une administration intra-amygdalienne de KA entraîne une crise d'épilepsie d'origine limbique associée à une mort neuronale dans l'hippocampe qui ressemble à la sclérose hippocampique (Ben Ari et al., 1979; BenAri, 1985).

### IV.2.1. Administration de kainate et induction de crises aiguës d'origine limbique

#### IV.2.1.1. Signes cliniques

La survenue des signes clinique associés aux crises induites par une injection de KA en intraperitonéale (Ben Ari et al., 1981) ou en intraventriculaire (Lothman and Collins, 1981) est progressive dans le temps. On distingue différentes phases : pendant les premières 20-30 min l'animal a un regard fixe et une posture immobile. Ensuite, l'animal fait des mouvements avec la tête de haut en bas associés à des secousses de « chiens mouillés » pendant environ trente minute. Pendant la phase suivante, qui commence environ une heure après l'injection de KA, l'animal présente des crises motrices isolées de type limbique associées à des mastications, des mouvements faciaux, des tremblements des pattes antérieures, des soulèvements sur les pattes arrières et des pertes du contrôle postural (Ben Ari et al., 1981; Fig. 32A). Les crises deviennent ensuite plus fréquentes, plus complexes et plus longues avec une réduction de la pause interictale (stade IV et V racine 1972). Ensuite l'animal présente un *status epilepticus* complet avec des convulsions permanentes. Les crises induites par injection de KA on été décrites comme des crises motrices limbiques secondairement généralisées (Ben Ari et al., 1981) et ne doivent pas être confondues avec des crises immédiatement généralisées qui produisent des mouvements tonico-cloniques (comme celles observées après injection d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub>). Depuis, d'autres modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal ont été décrits comme le modèle par injection de pilocarpine que nous avons utilisé. Les crises aiguës observées dans ces modèles sont similaires à celles observées dans le modèle KA (Turski et al., 1983).



**Figure 33. Rôle des fibres moussues dans la genèse d'activités épileptiformes par application de kainate sur tranche**

Après irradiation néonatale, la majorité des cellules granulaires ne se développe pas. En l'absence de fibres moussues et des sites de liaison à haute affinité pour le kainate, des applications de kainate ne génèrent plus d'activités épileptiformes.

D'après Gaiarsa et al., 1994

#### IV.2.1.2. Activités électriques associée aux crises induites par injections de kainate

Des enregistrements électrophysiologiques de régions corticales et sous-corticales montrent que les trois phases comportementales des crises induites par le KA correspondent respectivement à une décharge paroxystique dans l'hippocampe pour la phase de « regard vide », propagation des décharges à d'autres structures pour les crises motrices limbiques isolées et enfin généralisation à des structures non-limbiques pour le status épilepticus (Ben Ari et al., 1981). L'hippocampe génère des crises après injection de faibles doses de KA, en accord avec les résultats des expériences d'application de KA sur tranche (Robinson and Deadwyler, 1981) et avec la révélation des sites de liaison du [3H]KA par autoradiographie montrant que l'hippocampe est une des structures les plus riches en récepteurs KA (Monaghan and Cotman, 1982).

#### IV.2.1.3. Rôle des récepteurs kainate dans l'induction des crises en aiguë

Nous avons vu que l'administration systémique de KA pouvait induire des crises d'épilepsie associées à des décharges paroxystiques dans la région hippocampique. Un certain nombre d'arguments suggèrent que cet effet est dû à une action directe du KA sur les récepteurs KA à haute affinité présents au niveau des fibres moussues (pour revue voir Ben Ari and Cossart, 2000; BenAri, 1985). En effet, les concentrations de KA qui traversent la barrière hémato-encéphalique pour induire des décharges paroxystiques dans l'hippocampe sont très faibles (50-250 nM) et inférieures aux concentrations nécessaires pour activer les récepteurs AMPA (Berger et al., 1986). Des concentrations similaires permettent d'évoquer des activités épileptiformes dans l'hippocampe *in vivo* (Debonnel et al., 1989) ou *in vitro* (Ben Ari and Gho, 1988; Fisher and Alger, 1984; Robinson and Deadwyler, 1981). De plus, les crises motrices limbiques après injections de KA ne sont pas observées avant la troisième semaine de vie post-natale et le développement complet des fibres moussues (Cherubini et al., 1983; Tremblay et al., 1984). Des expériences *in vitro* utilisant une préparation d'hippocampes intacts montrent que le profil développemental des activités épileptiformes induites par le KA est corrélé avec l'amplitude des courants KA post-synaptiques enregistrés dans les cellules pyramidales de CA3 (Khalilov et al., 1999). Enfin, lorsque le développement des fibres moussues est empêché par une irradiation néonatale, le KA ne produit plus de crises lorsqu'il est appliqué sur des tranches d'hippocampe (Gaiarsa et al., 1994, Fig. 33). Plus récemment, il a été montré que des applications de KA ne généraient pas de crises au niveau de tranches

d'hippocampe de souris mutantes pour la sous-unité GluR6 des récepteurs KA. Ces souris ne présentent également pas de récepteurs KA post-synaptiques au niveau des fibres moussues (Mulle et al., 1998). L'induction de crises comportementales *in vivo* au niveau de ces souris par injection systémique de KA nécessite une augmentation de la dose de KA injectée (Mulle et al., 1998). Le type de crises observé après ces injections de fortes doses de KA (30mg/Kg) n'a pas été décrit donc on ne sait pas s'il s'agit des crises limbiques motrices caractéristiques ou s'il s'agit de crises tonico-cloniques qui peuvent être observées après l'administration de fortes doses de KA (quatre à cinq fois la dose mortelle (BenAri, 1985) .

#### IV.3. Modèles animaux d'épilepsie chronique du lobe temporal

Dans la partie précédente, nous nous sommes intéressés aux crises *aiguës* induites directement par injection d'un agent convulsivant à des *animaux sains*. Nous allons maintenant nous intéresser à des *animaux chroniquement épileptiques* qui présentent des *crises spontanées* non induites par des stimulations électriques ou chimiques. Les travaux concernant l'ictogénicité du KA ont abouti à la mise au point d'un modèle d'épilepsie chronique du lobe temporal chez le rat. Donc en plus d'être *ictogène*, le KA est également *épileptogène*. En effet, après injection de KA et induction d'un *status epilepticus* pendant plusieurs heures, les animaux injectés présentent, après une période de silence de plusieurs semaines, des crises spontanées récurrentes d'origine limbique (BenAri, 1985; Cavalheiro et al., 1982; Tremblay and Ben Ari, 1984). Des travaux précédents avaient montré que des animaux chroniquement épileptiques pouvaient être obtenus sans *status epilepticus* après induction de nombreuses crises de stade V par des stimulations intra-cérébrales ( « *kindling* » Racine, 1972; Goddard et al., 1969; Pinel and Rovner, 1978). Mais le très grand nombre de crises à induire avant d'arriver au stade chronique (entre 90-100 crises de stade V; Sayin et al., 2003) a limité l'utilisation de cette technique pour induire des animaux chroniquement épileptiques (pour revue voir Morimoto et al., 2004). Ainsi, la méthode la plus couramment utilisée à l'heure actuelle pour induire des animaux chroniquement épileptiques est l'induction d'un *status epilepticus* par injection d'agents convulsivants (le KA ou la pilocarpine). On parle de modèle d'épilepsie chronique « *post-status* ». Dans la suite du chapitre nous allons particulièrement nous intéresser aux modifications induites au niveau de l'hippocampe dans les modèles « *post-status* » d'épilepsie du lobe temporal.

#### IV.3.1. Patron de mort neuronale

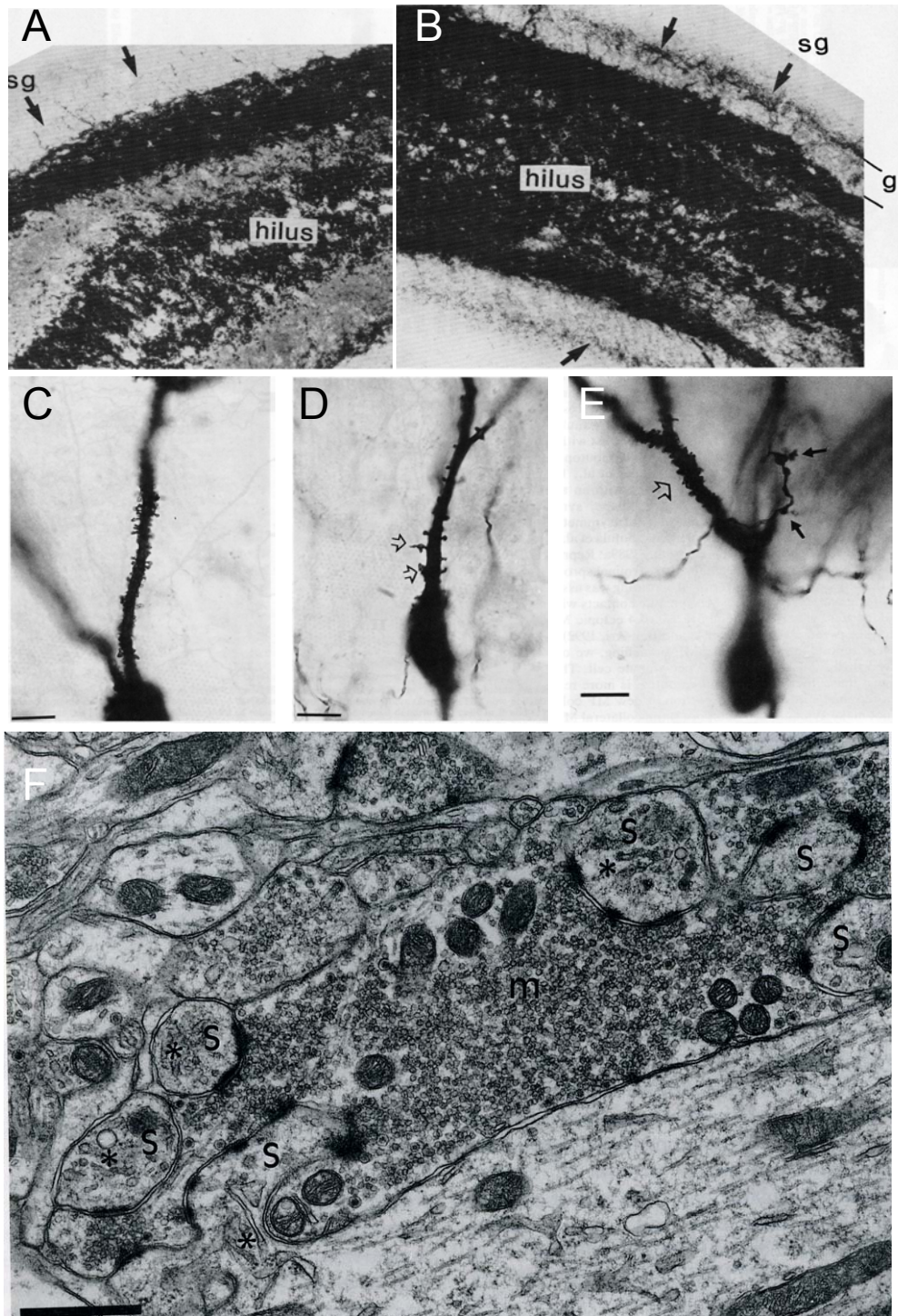
Le patron de mort neuronale observé dans les modèles expérimentaux d'épilepsie du lobe temporal ressemble à celui observé dans la sclérose hippocampique. Globalement, la sévérité du pattern de mort neuronal observé est corrélée à la dose d'agent convulsivant injecté et à la durée du *status epilepticus*.

##### IV.3.1.1. Au niveau des cellules principales

Dans les modèles KA et pilocarpine, la région principalement touchée est la région CA3 et le hilus. La région CA1 est moins affectée et le gyrus denté est relativement bien préservé (Covolan et al., 2000). Ce pattern de mort neuronal ressemble à celui observé dans un sous-type de sclérose hippocampique chez l'homme appelé *endfolium-sclérosis*. Dans le modèle KA, les mécanismes de dégénérescence des cellules pyramidales de la région CA3 ont été largement étudiés (Pollard et al., 1994). A ce niveau, une mort neuronale précoce nécrotique, due à un phénomène d'excitotoxicité (Fujikawa et al., 2000) est suivie d'une mort neuronale plus tardive mettant en jeu l'activation de voies de signalisation spécifiques de la mort cellulaire de type apoptotiques (Pollard et al., 1994). La mort par excitotoxicité s'accompagne d'une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Choi, 1987) associé à un enfllement des dendrites (Olney et al., 1979). Dans le hilus, la dégénérescence des cellules moussues a également été rapportée (mais voir Scharfman et al., 2001).

##### IV.3.1.2. Au niveau des interneurones

La mort des interneurones a été décrite au niveau du hilus dans les différents modèles d'épilepsie du lobe temporal (Kobayashi and Buckmaster, 2003; Buckmaster and Jongen-Relo, 1999; Obenaus et al., 1993; Dudek and Shao, 2003; Shao and Dudek, 2005 ; pour revue voir Cossart et al., 2005). Parmi les différents types d'interneurones, ceux contenant la somatostatine et la parvalbumine semblent principalement affectés (Buckmaster and Jongen-Relo, 1999; Gorter et al., 2001; Kobayashi and Buckmaster, 2003; Maglóczy and Freund, 1995; Obenaus et al., 1993; Sloviter, 1987; Sperk et al., 1992).



**Figure 34. Bourgeonnement des fibres moussues**

A. Marquage Timm chez un rat contrôle.

B. Marquage Timm 30 jours après un status epilepticus induit par injection de kainate. Notez l'apparition du marquage au niveau supragranulaire (sg).

C,D,E. Marquage golgi de cellules granulaires chez un rat contrôle (C) et épileptique chronique (D,E). Notez la présence d'épines géantes (D) et d'excroissances épineuses (E) chez le rat épileptique chronique.

F. Complexe moussu géant chez le rat épileptique chronique en microscopie électronique. (S: épine).

D'après Represa et al., 1987 (A); Represa et al., 1993 (C-F)

Récemment, des études ont révélé que des interneurons dégénéraient également dans la région CA1 (Andre et al., 2001; Cossart et al., 2001a; Houser and Esclapez, 1996; Morin et al., 1998; Smith and Dudek, 2001). Ces interneurons contiennent également la somatostatine et la parvalbumine (Andre et al., 2001; Cossart et al., 2001a; Best et al., 1993; Best et al., 1994; Boullier et al., 2000), mais la mort des interneurons contenant la parvalbumine affecte principalement les interneurons de type chandelier qui contactent le segment initial de l'axone des cellules pyramidales de CA1 (Dinocourt et al., 2003) et pas les cellules en panier qui contiennent également la parvalbumine (Cossart et al., 2001a). Dans le gyrus denté la mort des interneurons intervient rapidement après le *status epilepticus* et ne peut à elle seule expliquer la survenue des crises récurrentes. Cette mort est plus importante dans le modèle KA que dans le modèle pilocarpine et serait globalement plus prononcée dans les modèles animaux que dans la sclérose hippocampique observée chez l'homme (pour revue voir Cossart et al., 2005; Maglóczy and Freund, 2005).

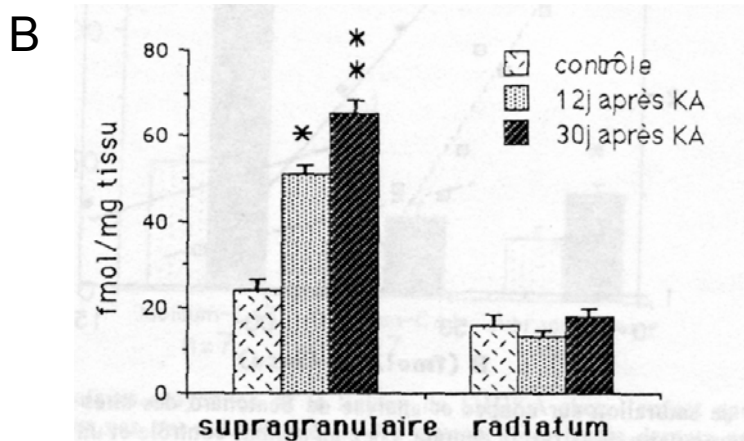
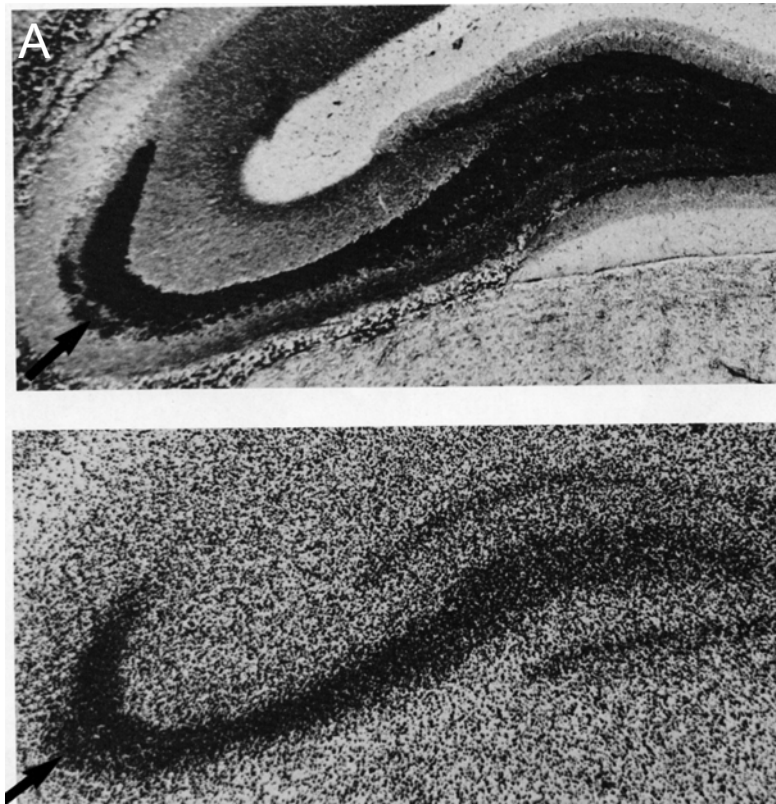
#### IV.3.2. Bourgeonnement des fibres moussues

Comme dans la sclérose hippocampique chez l'homme, un bourgeonnement des fibres moussues a été observé dans les modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal en utilisant différentes techniques dont le marquage Timm qui permet de marquer le zinc sélectivement contenu dans les boutons moussus (Cronin and Dudek, 1988; Mello et al., 1993; Nadler et al., 1980; Represa et al., 1987; Sutula et al., 1988; Fig. 34A et B), l'autoradiographie après liaison de [3H]KA (Represa et al., 1987), la reconstruction de cellule après injection de biocytine in vitro (Okazaki et al., 1995) et in vivo (Buckmaster and Dudek, 1999; Sutula et al., 1998; Wenzel et al., 2000). Ces fibres arborisent dans le hilus et dans la couche moléculaire interne du gyrus denté. A ce niveau, elles viennent former des boutons moussus caractéristiques mais de diamètre inférieur à ceux observés dans le stratum lucidum de la région (Cavazos et al., 2003; Okazaki et al., 1995; Represa et al., 1993; Sutula et al., 1998; Wenzel et al., 2000; Fig. 34 C-F). Ces fibres contactent principalement les cellules granulaires mais également des interneurons dans la couche moléculaire (Buckmaster et al., 2002). Les études sur les modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal ont permis de montrer que ces synapses récurrentes étaient fonctionnelles (Molnar and Nadler, 1999; Scharfman et al., 2003; Tauck and Nadler, 1985; Wuarin and Dudek, 1996; Wuarin and Dudek, 2001). Les travaux pionniers de Tauck et Nadler montrent en effet que, contrairement au gyrus denté de rats contrôles, le gyrus denté de rats épileptiques chroniques peut générer des activités de réseau récurrentes de

type intérielles après activation d'un petit nombre de cellules granulaires par stimulation antérograde des fibres moussues (Tauck and Nadler, 1985). Ce type d'activité a été précédemment décrit au niveau de la région CA3 et implique l'activation des fibres récurrentes (Miles and Wong, 1983). Les études suivantes confirment la fonctionnalité de ce circuit récurrent excitateur en combinant la stimulation focale d'un petit groupe de cellules granulaires par libération de glutamate cagé avec l'enregistrement en patch clamp d'une cellule granulaire distante. Dans ces conditions, la stimulation provoque pendant quelques secondes à une minute une augmentation de la fréquence des événements excitateurs dans la cellule granulaire enregistrée chez le rat épileptique chronique. Cette augmentation est due à un couplage synaptique direct entre les cellules granulaires stimulées et la cellule enregistrée car aucune augmentation n'est observée chez le rat contrôle (Molnar and Nadler, 1999; Wuarin and Dudek, 2001). Récemment, la preuve directe du couplage entre les cellules granulaires dans le rat épileptique a été obtenue par Hélène Scharfmann qui a enregistré 5 paires connectées sur 900 paires testées (Scharfman et al., 2003). Cette expérience suggère que la connectivité 1 : 1 n'est pas si faible dans le réseau récurrent moussu si on la rapporte au nombre total de cellules granulaires (1 million chez le rat). L'enregistrement de cellules granulaires a également permis de montrer que, du fait du réseau récurrent excitateur mais peut être aussi de la perte d'un certain nombre d'interneurones, la fréquence des événements excitateurs spontanés était fortement augmentée dans les cellules granulaires de rats épileptiques chroniques comparés à des rats contrôles (Wuarin and Dudek, 2001).

Le bourgeonnement moussu est un processus progressif qui commence vraisemblablement peu de temps après l'induction du status épilepticus et qui se poursuit tout au long de la vie de l'animal (Nadler, 2003). Le taux de bourgeonnement moussu en fonction du temps a été estimé par Wuarin et Dudek (en utilisant les score de marquage Timm de Tauck et Nadler., 1985). Le bourgeonnement atteint son maximum à partir de 10 semaines après le status. Ces auteurs ont ensuite trouvé une corrélation positive entre le taux de bourgeonnement moussu, la fréquence des crises spontanées exprimées par les animaux, la fréquence des EPSCs enregistrés dans les cellules granulaires, et la facilité d'induction d'activités épileptiformes sur tranche (Wuarin and Dudek, 2001). Les synapses des fibres moussues récurrentes gardent certaines propriétés identiques aux synapses moussues formées au niveau des cellules pyramidales de CA3 dans le rat contrôle comme une sensibilité au DCGIV et une *frequency facilitation* (Feng et al., 2003) ainsi que la possibilité de libérer de la dynorphine (Tu et al., 2005).





**Figure 35. Liaison de kainate radioactif et bourgeonnement des fibres moussues**

A. Correspondance entre le bourgeonnement des fibres moussues visualisé par un marquage Timm (haut) et les sites de liaison du  $[3H]KA$  révélés par autoradiographie (bas).

B. Augmentation de la liaison du  $[3H]KA$  au niveau de la couche supragranulaire après induction d'un status epilepticus par injection de KA.

L'ensemble de ces résultats associé aux résultats obtenus à partir de tranches de patients épileptiques suggère que le bourgeonnement moussu observé chez les patients atteints d'épilepsie du lobe temporal puisse être également fonctionnel et avoir des implications pathologiques.

#### IV.3.3. Récepteurs ionotropiques glutamatergique et épilepsie du lobe temporal

Comme nous l'avons vu, l'organisation des synapses glutamatergiques de l'hippocampe de rats chroniquement épileptiques est fortement modifiée. Des phénomènes de plasticité des épines dendritiques ont été décrits au niveau des cellules granulaires dans la couche moléculaire interne du gyrus denté (Isokawa, 1998;Isokawa, 2000). Après une baisse initiale du nombre d'épine dendritique, qui correspondrait à la dégénérescence des afférences glutamatergiques en provenance des cellules moussues, on observe, à partir d'une semaine, une augmentation du nombre de ces épines qui correspondrait à la formation progressive des fibres moussues récurrentes (Represa et al., 1993). Ces phénomènes sont associés à la surexpression d'une protéine impliquée dans la plasticité des épines dendritiques, la calponine acide, au niveau de la couche moléculaire interne pendant les deuxième et troisième semaine qui suivent le *status epilepticus* (Ferhat et al., 2003).

Des modifications ont également été rapportées en terme d'expression des sous-unités codant pour les récepteurs ionotropiques glutamatergiques. Des études d'hybridation in situ montrent une augmentation de l'expression des sous-unités GluR2 et GluR3 des récepteurs NMDA au niveau du *stratum granulosum* ainsi qu'une augmentation de l'expression des sous-unités NR1 et NR2b des récepteurs NMDA (Babb et al., 1996;Mathern et al., 1998b;Mathern et al., 1998c;Suzuki et al., 2000). Concernant les récepteurs KA, peu de résultats sont disponibles. La seule étude réalisée sur des animaux épileptiques chroniques montre une augmentation des sites de liaison pour le [3H]KA au niveau de la couche moléculaire interne du gyrus denté dans le modèle KA (Represa et al., 1987; Fig. 35). Le même résultat a été observé chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (Represa et al., 1989). Une étude récente d'hybridation in situ chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal révèle une surexpression des sous-unités KA2 et GluR5 par cellule granulaire, et pas de modification au niveau des autres sous-unités(Mathern et al., 1998a). Cette augmentation n'est observée que chez les patients présentant une sclérose hippocampique.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à rechercher des modifications de la transmission synaptique due à l'activation des récepteurs kainate après bourgeonnement des fibres moussues chez le rats épileptique chronique.

-Article 1-

Quantal release of glutamate generates pure KA and mixed AMPA/KA EPSCs in hippocampal neurons.

Cossart R<sup>+</sup>, Epsztein J<sup>+</sup>, Tyzio R, Becq H, Hirsch J Ben-Ari Y and Crépel V

+ : contribution équivalente des auteurs. *Neuron*. 2002 Jul 3;35(1):147-59.

Les récepteurs KA participent à la transmission synaptique excitatrice dans de nombreuses structures du système nerveux. Mais l'activation des récepteurs KA n'est souvent observée qu'après stimulation forte et/ou à haute fréquence des fibres afférentes. Ces résultats suggèrent que les récepteurs KA participent à la transmission synaptique excitatrice uniquement lorsque de grandes quantités de glutamate sont libérées et ont une localisation extrasynaptique. Une telle localisation pourrait de plus expliquer la cinétique lente des événements synaptiques KA. Cependant, des travaux réalisés chez le jeune au niveau des synapses thalamo-corticales suggéraient que les récepteurs KA pouvaient être activés dans des conditions plus physiologiques. Pour déterminer si les récepteurs KA pouvaient participer à la transmission synaptique dans des conditions de faible activité, nous avons voulu savoir si les récepteurs KA pouvaient être activés par la libération quantique de glutamate. Nous avons enregistré les événements miniatures glutamatergiques non-NMDA en présence de bloqueurs des récepteurs NMDA (D-APV 40 $\mu$ M) et GABA (bicuculline 10 $\mu$ M) et d'un bloqueur des canaux sodiques, le TTX (1 $\mu$ M) pour bloquer les potentiels d'action. Ces événements miniatures ont été enregistrés dans les cellules au niveau desquelles des EPSC<sub>KA</sub> avaient été précédemment évoqués : les cellules pyramidales de la région CA3 et les interneurons de la région CA1 mais également dans un type cellulaire au niveau duquel aucun EPSC<sub>KA</sub> n'avait pu être évoqué: les cellules pyramidales de la région CA1. Nous avons dans un premier temps observé que la cinétique des événements miniatures glutamatergiques non-NMDA n'était pas homogène dans les cellules pyramidales de la région CA3 et dans les interneurons de la région CA1. En plus des événements ayant une cinétique rapide, classiquement décrits, nous avons enregistré des événements ayant une cinétique lente et des événements ayant une cinétique double avec une première phase rapide suivie d'une deuxième phase plus lente. En présence d'antagonistes des récepteurs AMPA (GYKI 52466 100  $\mu$ M, GYKI 53655 30  $\mu$ M, NBQX 1 $\mu$ M) seuls les événements ayant une cinétique lente sont observés. Ces événements sont ensuite bloqués par l'ajout d'un antagoniste mixte des récepteurs AMPA/KA le CNQX (50 $\mu$ M) ce qui indique qu'ils sont dus à l'activation des récepteurs KA. Donc les récepteurs KA post-synaptiques peuvent être activés par la libération quantique de glutamate et génèrent des EPSC<sub>KA</sub> ayant une cinétique plus lente et une amplitude plus faible que les EPSC<sub>AMPA</sub> enregistrés dans les mêmes cellules.

La double cinétique des événements doubles correspond à la cinétique rapide des EPSC<sub>AMPA</sub> et à la cinétique lente des EPSC<sub>KA</sub>. De plus, ces événements ne sont plus observés

en présence d'antagonistes des récepteurs AMPA. Ces résultats suggèrent que la composante rapide des événements doubles est due à l'activation des récepteurs AMPA et que la composante lente est due à l'activation des récepteurs KA. En accord avec cette hypothèse, les événements doubles ne sont plus observés en présence d'antagonistes des récepteurs AMPA. Dans ce cas, les événements doubles ne devraient également plus être observés lorsque les récepteurs KA sont bloqués. Pour déterminer si la composante lente de ces événements est due à l'activation de récepteurs KA post-synaptiques, nous avons utilisé le SYM 2081 comme un antagoniste fonctionnel des récepteurs KA. En effet, le SYM 2081 désensibilise durablement les récepteurs KA. En présence de SYM 2081 (10 $\mu$ M), aucun événement double n'est observé ce qui suggère qu'en plus de l'activation des récepteurs AMPA, l'activation des récepteurs KA post-synaptiques contribue à générer ces événements.

Si les récepteurs KA peuvent être activés par la libération quantique de glutamate, la stimulation minimale des fibres glutamatergiques devrait pouvoir activer les récepteurs KA post-synaptiques. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé la stimulation minimale des fibres moussues en positionnant une électrode de stimulation dans le stratum lucidum de la région CA3 (Jonas et al., 1993) tout en enregistrant une cellule pyramidale de CA3. Nos résultats montrent que de telles stimulations génèrent des événements ayant une cinétique double dans les cellules pyramidales de CA3. La composante rapide est bloquée par les antagonistes des récepteurs AMPA et la composante lente par un antagoniste mixte AMPA/KA. Ce résultat confirme que la composante rapide des événements double est due à l'activation des récepteurs AMPA et que la composante lente est due à l'activation des récepteurs KA. Nous avons de plus observé que les amplitudes des composantes rapides et lentes de l'événement double étaient corrélées ce qui suggère qu'au niveau des cellules pyramidales de la région CA3, les récepteurs AMPA et KA sont co-localisés au sein des mêmes densités post-synaptiques. Des stimulations minimales au niveau du stratum oriens permettent d'évoquer des événements purement KA dans les interneurons de la région CA1. Ce résultat confirme l'activation des récepteurs KA par la libération quantique de glutamate au niveau des interneurons de la région CA1 et suggère que dans ces cellules les récepteurs AMPA et KA peuvent être localisés au niveau de synapses différentes.

Après avoir caractérisé cinétiquement et pharmacologiquement les EPSC<sub>AMPA</sub> et EPSC<sub>KA</sub>, nous avons utilisé des critères cinétiques pour les différencier en l'absence d'antagoniste des récepteurs AMPA et déterminer leurs contributions respectives à la transmission synaptique miniature glutamatergique non-NMDA en présence de TTX (1 $\mu$ M) bicuculline (10 $\mu$ M) et de D-APV (40  $\mu$ M). Nos résultats montrent que dans les deux types

cellulaires étudiés les EPSC<sub>KA</sub> représentent une part significative de l'ensemble des événements miniatures glutamatergiques non-NMDA. De plus cette analyse révèle que, dans les cellules pyramidales de la région CA3, les récepteurs KA sont principalement co-activés avec les récepteurs AMPA alors que dans les interneurons de la région CA1 ils sont préférentiellement activés seuls.

Enfin, si les récepteurs KA peuvent être activés par la libération quantique de glutamate, on devrait pouvoir observer des événements ayant les caractéristiques cinétiques et pharmacologiques des EPSC<sub>KA</sub> dans l'activité spontanée des cellules pyramidales de CA3 et des interneurons de CA1. Nous avons donc enregistré ces deux types cellulaires en configuration voltage imposé, à  $-60\text{mV}$  (le potentiel d'inversion des événements GABAergiques dans nos conditions expérimentales) un potentiel auquel les événements dus à l'activation des récepteurs NMDA sont principalement bloqués par le magnésium. Dans ces conditions, nous avons observé de nombreux événements lents et doubles. Seuls les événements lents étaient observés en présence d'antagonistes des récepteurs AMPA et ces événements étaient bloqués par ajout d'un antagoniste mixte des récepteurs AMPA et KA. L'enregistrement des cellules pyramidales de la région CA1 montre au contraire que tous les événements enregistrés dans ces conditions ont des cinétiques rapides comparables avec celles des EPSC<sub>AMPA</sub> enregistrés dans les cellules pyramidales de la région CA3. Tous ces événements sont bloqués en présence d'antagonistes des récepteurs AMPA ce qui confirme que les cellules pyramidales de CA1 n'expriment pas de récepteurs KA post-synaptiques (Bureau et al., 1999;Frerking et al., 1998).

Dans une dernière expérience nous avons voulu déterminer si les EPSC<sub>KA</sub> enregistrés dans les cellules pyramidales de la région CA3 étaient spécifiquement générés au niveau des synapses moussues. Nous avons enregistré les événements synaptiques glutamatergiques non-NMDA dans les cellules pyramidales de tranches organotypiques une semaine après ablation mécanique du gyrus denté et dégénérescence complète des fibres moussues. Nos résultats montrent que dans ces conditions plus aucun événement lent et double n'est observé. De plus tous les événements enregistrés dans ces cellules sont bloqués par un antagoniste sélectif des récepteurs AMPA. Les résultats montrent une baisse significative de la fréquence des événements doubles comparé aux cellules pyramidales de CA3 enregistrées dans des tranches organotypiques en présence du gyrus denté. La baisse de la fréquence des événements lents n'est pas significative. Ces résultats nous ont permis de conclure que les événements doubles étaient sélectivement générés au niveau des fibres moussues.

L'ensemble de ce travail a permis de répondre à plusieurs questions importantes concernant les récepteurs KA post-synaptiques :

- 1- Les récepteurs KA post-synaptiques peuvent être activés par la libération quantique de glutamate.
- 2- La cinétique lente des EPSC<sub>KA</sub> ne peut s'expliquer par une localisation extrasynaptique de ces récepteurs mais est une propriété intrinsèque de ces récepteurs-canaux et des protéines qui leur sont associées (voir discussion).
- 3- La contribution des récepteurs KA à la transmission synaptique glutamatergique est importante dans des conditions de faible activité et n'est pas limitée à des niveaux d'activité élevés et/ou pathologiques.
- 4- Les récepteurs KA sont principalement co-activés avec les récepteurs AMPA au niveau des cellules pyramidales de la région CA3 et principalement activés seuls au niveau des interneurons de la région CA1.
- 5- Dans les cellules pyramidales de CA3 les EPSC<sub>AMPA/KA</sub> sont sélectivement générés au niveau des synapses moussues.

Ce travail confirme également un certain nombre de données concernant la transmission synaptique due à l'activation des récepteurs KA notamment que, pour les cellules pyramidales de la région CA1, la transmission synaptique glutamatergique ne passe pas par l'activation de récepteurs KA post-synaptiques contrairement aux cellules pyramidales de la région CA3 et aux interneurons de la région CA1.



# Quantal Release of Glutamate Generates Pure Kainate and Mixed AMPA/Kainate EPSCs in Hippocampal Neurons

Rosa Cossart,<sup>2</sup> Jérôme Epsztein,<sup>2</sup>  
Roman Tyzio, Hélène Becq, June Hirsch,  
Yehezkel Ben-Ari,<sup>1</sup> and Valérie Crépel  
INMED-INSERM U.29 and  
Université de La Méditerranée  
Parc scientifique de Luminy  
BP 13  
13273 Marseille Cedex 9  
France

## Summary

The relative contribution of kainate receptors to ongoing glutamatergic activity is at present unknown. We report the presence of spontaneous, miniature, and minimal stimulation-evoked excitatory postsynaptic currents (EPSCs) that are mediated solely by kainate receptors (EPSC<sub>kainate</sub>) or by both AMPA and kainate receptors (EPSC<sub>AMPA/kainate</sub>). EPSC<sub>kainate</sub> and EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> are selectively enriched in CA1 interneurons and mossy fibers synapses of CA3 pyramidal neurons, respectively. In CA1 interneurons, the decay time constant of EPSC<sub>kainate</sub> (circa 10 ms) is comparable to values obtained in heterologous expression systems. In both hippocampal neurons, the quantal release of glutamate generates kainate receptor-mediated EPSCs that provide as much as half of the total glutamatergic current. Kainate receptors are, therefore, key players of the ongoing glutamatergic transmission in the hippocampus.

## Introduction

There are three main types of glutamatergic ionotropic receptors: NMDA, AMPA, and kainate receptors. In contrast to AMPA and NMDA receptors (and despite their widespread expression throughout the brain), little is known about the properties of kainate receptors containing synapses in adult central neurons and the contribution of kainate receptors to the ongoing synaptic transmission. With the development of selective antagonists that block AMPA, but not kainate receptors (Paternain et al., 1995; Wilding and Huettnner, 1995), excitatory postsynaptic currents (EPSCs) with a kainate receptor-mediated component have been identified in the hippocampus (Ben Ari and Cossart, 2000; Bureau et al., 1999; Castillo et al., 1997; Cossart et al., 1998; Frerking et al., 1998; Vignes and Collingridge, 1997), the amygdala (Li and Rogawski, 1998), the cerebellum (Bureau et al., 2000), the spinal cord (Li et al., 1999), the retina (DeVries, 2000), and in the immature neocortex (Kidd and Isaac, 1999). In most of these studies, bulk stimulation of synaptic inputs evoked a mixed AMPA/kainate receptor-mediated EPSC with a large AMPA component and a small kainate one. In addition, whereas a single stimulus

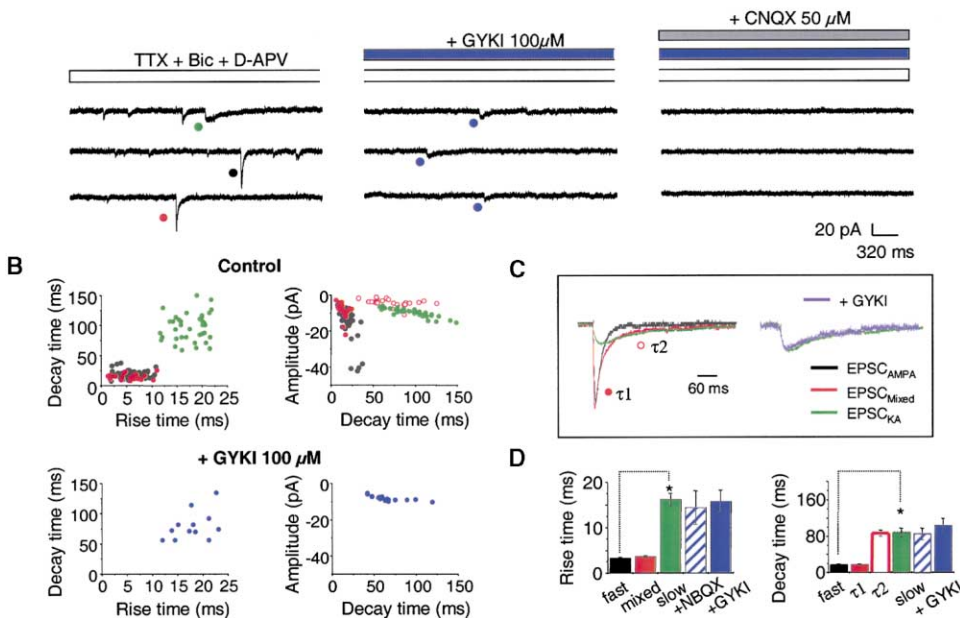
readily evoked the AMPA component of the EPSCs, the kainate component required repetitive and/or strong stimulations. This has led to the suggestion that kainate receptors may be located extrasynaptically, as they are only activated when large amounts of glutamate are released (see Frerking and Nicoll, 2000, and Lerma et al., 2001, for a review). Another problem is the discrepancy between the decay time constant of bulk stimulation-evoked kainate receptor-mediated EPSCs and the rapid kinetics of currents generated by homomeric kainate receptors expressed in heterologous expression cells (ibid). This has led to the suggestion that in vivo, either there is a complex subunit composition of kainate receptors or that special mechanisms regulate the kinetics of the current (ibid). Taken altogether, these studies suggest that glutamatergic synaptic transmission is entirely mediated by AMPA receptors (and NMDA receptors when the Mg<sup>2+</sup> block is alleviated), with the contribution of kainate receptors being restricted to special conditions in which hyperactivity leads to enhanced glutamate release (such as seizures that have been classically associated with kainate receptor activation) (Ben Ari and Cossart, 2000). If kainate receptors participate in ongoing glutamatergic transmission, then the quantal release of glutamate will generate spontaneous and miniature EPSCs mediated by kainate receptors (EPSC<sub>kainate</sub>). The study of these events will give an indication on the contribution of kainate receptors to ongoing synaptic transmission and an estimation of the genuine kinetics of EPSC<sub>kainate</sub>. Indeed, when many axons are activated by bulk stimulation or repetitive stimuli, the kinetics of EPSCs may be affected by different processes, including desensitization of receptors and summation of individual events.

In the present study, we report the presence of TTX-resistant miniature EPSCs generated by the activation of kainate receptors by the quantal release of glutamate. These EPSCs are of two types in mature hippocampal neurons: pure EPSC<sub>kainate</sub> generated in synapses that possess kainate, but not AMPA, receptors and mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> generated in synapses endowed of both types of receptors. Most interestingly, these EPSCs have a preferential distribution in the hippocampus: pure EPSC<sub>kainate</sub> are enriched in CA1 interneurons and mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> in CA3 pyramidal neurons at mossy fiber synapses. In contrast, only pure EPSC<sub>AMPA</sub> are generated in CA1 pyramidal neurons that do not express functional postsynaptic kainate receptors (Bureau et al., 1999). The kinetics of pure EPSC<sub>kainate</sub> in CA1 interneurons—albeit slower than the EPSC<sub>AMPA</sub>—are much faster than those reported with bulk stimulations of afferent fibers and are compatible with values obtained in heterologous expression systems. To estimate the relative contribution of AMPA and kainate receptors to the tonic glutamatergic transmission, we have performed a quantitative estimation of the total current mediated by kainate receptors. Our observations show that kainate receptors are key players of the ongoing ionotropic glutamatergic transmission in the hippocampus.

<sup>1</sup>Correspondence: ben-ari@inmed.univ-mrs.fr

<sup>2</sup>These authors contributed equally to this work.

## A CA3 pyramidal cell



**Figure 1.** EPSCs<sub>kainate</sub> Can Be Isolated from mEPSCs Based on Their Pharmacological and Kinetic Profile in CA3 Pyramidal Cells

(A) Miniature EPSCs recordings in the presence of TTX (1  $\mu$ M), bicuculline (10  $\mu$ M), and D-APV (50  $\mu$ M) from a representative CA3 pyramidal cell, show that mEPSC<sub>kainate</sub> (closed purple circle) can be isolated pharmacologically when GYKI 52466 (100  $\mu$ M) is added to the saline and blocked by CNQX (50  $\mu$ M); Vh:  $-60$  mV. Note that in control conditions in the CA3 pyramidal cell, three types of mEPSCs can be distinguished based on the time course of their decay: fast (closed black circle), slow (closed green circle), and mixed EPSCs with a double decaying phase (closed red circle). Traces are nonconsecutive.

(B) Scatter plots of the rise time constant (left column) or amplitude (right column) versus the decay time constant were calculated in 157 mEPSCs and recorded from a CA3 pyramidal cell in the absence (top) or in the presence of GYKI (100  $\mu$ M, bottom). Note that two families of events are clustered in separate areas of the graph, with the fast (closed black circle) and the slow events (closed green circle) having no significant correlation between rise and decay times within the two groups ( $r = 0.06$  and  $0.14$ , respectively). The decay time constant versus amplitude distributions obtained when plotting the first (closed red circle) and the second (open red circle) components of mixed events overlapped that of the fast (closed black circle) and slow event (closed green circle) families, respectively. In the presence of GYKI, only events with a slow time course and a small amplitude (closed purple circle) remain.

(C) Superimpositions of the digitally averaged traces of fast (black), mixed (red), and slow (green) mEPSCs and GYKI-resistant mEPSCs (purple). Note that slow events, the second component of mixed events, and GYKI-resistant events have the same time course.

(D) Bar graph of averaged values of rise times (left) and decay times (right) show that the time course of slow events, GYKI or NBQX (1  $\mu$ M)-resistant events, and the second component of mixed events ( $\tau_2$ ) are identical ( $p > 0.5$ ) but different from that of fast events ( $p < 0.05$ ;  $n = 25$ , eight and six cells for control, GYKI and NBQX experiments, respectively).

## Results

### Three Populations of Glutamatergic Miniature EPSCs in CA3 Pyramidal Cells and CA1 Interneurons

Whole-cell recordings of glutamatergic miniature activity were obtained from a total of 36 CA3 pyramidal cells and 26 CA1 stratum oriens interneurons. A majority of CA1 interneurons ( $n = 7$  out of 15 identified cells) recorded in stratum oriens corresponded to the previously described O-LM cells (oriens lacunosum moleculare interneurons) (Katona et al., 1999). Cells were filled with biocytin and morphologically identified post hoc. Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded in the presence of the sodium channel blocker TTX (1  $\mu$ M), the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline (10  $\mu$ M), and the NMDA receptor antagonist D-APV (50  $\mu$ M). Visual inspection of the kinetics of mEPSCs revealed three types of events in both CA3 pyramidal neurons and CA1 interneurons: fast, slow, and mixed events. The three populations of events were mediated by non-NMDA receptors, as they were blocked by the

AMPA/kainate receptor antagonist CNQX (50  $\mu$ M; Figures 1A and 2A). The plot of mEPSCs decay times versus 10%–90% rise times revealed the presence of slow (mEPSC<sub>slow</sub>) and fast (mEPSC<sub>fast</sub>) events that clustered within two separate areas of the graph (Figures 1B and 2B). A third group of events (mEPSC<sub>mixed</sub>) had a double exponential decay with the early and late decay time constants identical to those of the fast and slow monoexponential EPSCs, respectively (Table 1; Figures 1D and 2D). Interestingly, the distribution of the amplitude versus decay time of the two components of EPSC<sub>mixed</sub> overlapped that of the mEPSC<sub>fast</sub> and mEPSC<sub>slow</sub> (Figures 1B and 2B), suggesting that mixed events were the summation of fast and slow events. Bath applications of the selective AMPA receptor antagonist GYKI 52466 (100  $\mu$ M) blocked the fast events, indicating that they were mediated by AMPA receptors (i.e., mEPSC<sub>fast</sub> = mEPSC<sub>AMPA</sub>). Only slow mEPSCs were observed in the presence of GYKI 52466 (100  $\mu$ M; Figures 1A and 2A), but their frequency was reduced to  $59.4\% \pm 18.2\%$  of control in pyramidal cells ( $n = 8$ ) and to  $54\% \pm 20\%$  of

## A CA1 Interneuron

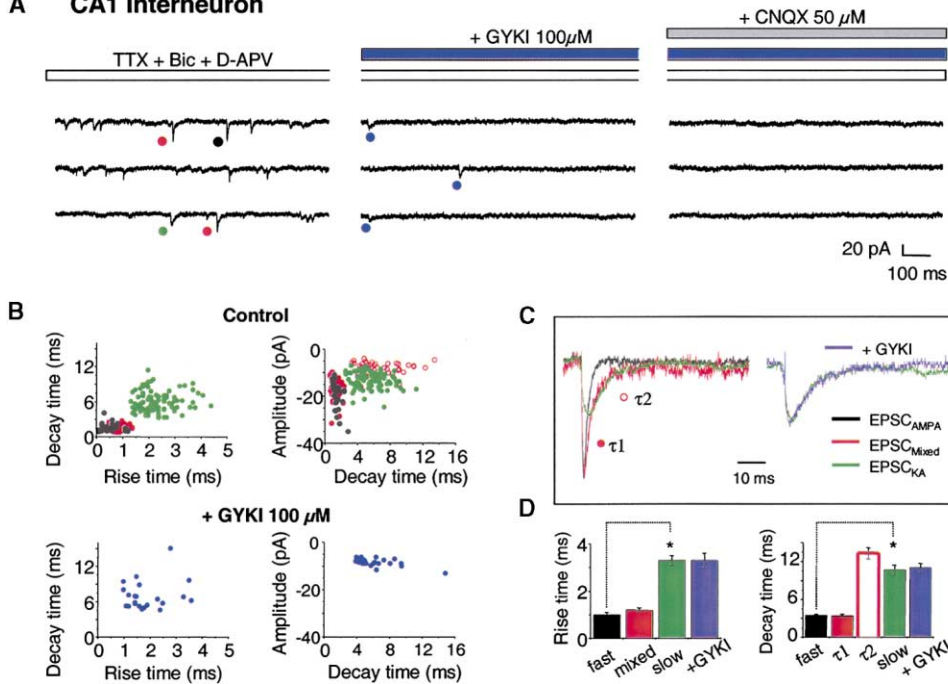


Figure 2. EPSC<sub>kainate</sub> Can Be Isolated from mEPSCs Based on Their Pharmacological and Kinetic Profile in CA1 Interneurons

(A) Miniature EPSCs recordings in the presence of TTX (1  $\mu$ M), bicuculline (10  $\mu$ M), and D-APV (50  $\mu$ M) from a representative CA1 stratum oriens interneuron show that mEPSC<sub>kainate</sub> (closed purple circle) can be isolated pharmacologically when GYKI 52466 (100  $\mu$ M) is added to the saline and blocked by CNQX (50  $\mu$ M); Vh:  $-60$  mV. Note that in control conditions in the CA1 interneuron, three types of mEPSCs can be distinguished based on the time course of their decay: fast (closed black circle), slow (closed green circle), and mixed EPSCs with a double decaying phase (closed red circle). Traces are nonconsecutive.

(B) Scatter plots of the rise time constant (left column) or amplitude (right column) versus decay time constant are shown, calculated in 110 mEPSCs recorded from a CA1 stratum oriens interneuron in the absence (top) or presence of GYKI (100  $\mu$ M, bottom). Note that two families of events are clustered in separate areas of the graph, the fast (closed black circle) and slow events (closed green circle), with no significant correlation between rise times and decays within the two groups ( $r = 0.1$  and  $0.14$ , respectively). The decay time constant versus amplitude distributions obtained when plotting the first (closed red circle) and the second (open red circle) components of mixed events overlapped that of the fast (closed black circle) and slow event (closed green circle) families, respectively. In the presence of GYKI, only events with a slow time course and a small amplitude (closed purple circle) remain.

(C) Superimpositions of the digitally averaged traces of fast (black), mixed (red), and slow (green) mEPSCs and of GYKI-resistant mEPSCs (purple) are illustrated. Note that slow events, the second component of mixed events, and GYKI-resistant events have the same time course.

(D) Bar graph of averaged values of rise times (left) and decay times (right) show that the time course of slow events, GYKI-resistant events, and the second component of mixed events ( $\tau_2$ ) are identical ( $p > 0.5$ ) but different from that of fast events (15 and 10 cells for control and GYKI experiments, respectively;  $*p < 0.05$ ).

control in interneurons ( $n = 10$ ). Only slow events were also observed in the presence of GYKI 53655 (30  $\mu$ M,  $n = 3$  in CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons) or a low concentration of NBQX (1  $\mu$ M,  $n = 6$  in CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons; data not shown) that also preferentially block AMPA receptors (Bureau et al., 1999). Slow mEPSCs recorded in the presence of GYKI (52466 or 53655) or NBQX were fully blocked by the AMPA/kainate receptor antagonist CNQX (50  $\mu$ M), indicating that they were mediated by kainate receptors (mEPSC<sub>kainate</sub>;  $r: 16.3 \pm 2.7$  ms and  $\tau: 98 \pm 17$  ms,  $n = 8$  for CA3 pyramidal cells;  $r: 3.3 \pm 0.3$  ms and  $\tau: 11.1 \pm 0.1$  ms,  $n = 10$  for CA1 interneurons). Miniature EPSC<sub>slow</sub> and mEPSC<sub>kainate</sub> represented the same population of events since (1) the group of events obtained when plotting EPSC<sub>kainate</sub> overlapped that of EPSC<sub>slow</sub>, but not that of EPSC<sub>fast</sub> (Figures 1B and 2B). (2) They had similar digitally obtained averages (Figures 1C and 2C). (3) They had similar rise and decay time values (Figures 1D and 2D; Table 1; chisquare  $> 0.5$ ).

GYKI (52466 or 53655) and NBQX also blocked mixed mEPSCs, suggesting that AMPA receptors contributed to their generation. In order to determine whether the slow component of the mixed mEPSCs was mediated by the activation of kainate receptors, we used a pharmacological agent, SYM 2081 (10  $\mu$ M), that selectively desensitizes kainate receptors (Li et al. 1999; DeVries, 2000). In the presence of SYM 2081, only AMPA receptor-mediated events were recorded in CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons (Figure 3), since all the SYM-resistant events were blocked by GYKI 52466 (100  $\mu$ M) or NBQX (1  $\mu$ M). In CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons, the mean kinetics of the AMPA receptor-mediated events recorded in the presence of SYM 2081 ( $r: 2.1 \pm 0.26$  ms and  $\tau: 11.7 \pm 2.3$  ms,  $n = 6$  in CA3 pyramidal cells;  $r: 0.72 \pm 0.1$  ms and  $\tau: 3.6 \pm 0.54$  ms,  $n = 5$  in CA1 interneurons) were not significantly different from those of the fast events recorded in control conditions ( $r: 2.8 \pm 0.45$  ms and  $\tau: 15.6 \pm 2.7$  ms,  $n = 6$  in CA3 pyramidal cells;  $r: 0.9 \pm 0.19$  ms and  $\tau: 3.6 \pm 0.19$

Table 1. Kinetics Properties of EPSC<sub>AMPA</sub>, EPSC<sub>K<sub>A</sub></sub>, and EPSC<sub>AMPA/K<sub>A</sub></sub> in Three Hippocampal Cell Types

Cell Type	Event Type	sEPSCs	mEPSCs	eEPSC
CA3 Pyramidal cells	EPSC <sub>AMPA</sub>	r: $3.5 \pm 0.5$ ms $\tau$ : $21.8 \pm 2.2$ ms A: $16.4 \pm 1.6$ pA (n = 6)	r: $3.4 \pm 0.22$ ms $\tau$ : $17.6 \pm 1.3$ ms A: $14 \pm 1.5$ pA (n = 25)	–
	EPSC <sub>K<sub>A</sub></sub>	r: $12.6 \pm 0.8$ ms $\tau$ : $91.3 \pm 11.4$ ms A: $9.1 \pm 1.2$ pA (n = 6)	r: $15.8 \pm 1.4$ ms $\tau$ : $92 \pm 10$ ms A: $8.5 \pm 0.7$ pA (n = 25)	–
	EPSC <sub>AMPA/K<sub>A</sub></sub>	r: $3.7 \pm 0.5$ ms $\tau$ 1: $18.8 \pm 2.8$ ms A1: $20 \pm 4$ pA $\tau$ 2: $94 \pm 13.8$ ms A2: $9.6 \pm 2.5$ pA (n = 6)	r: $3.6 \pm 0.19$ ms $\tau$ 1: $17.6 \pm 1.2$ ms A1: $9.8 \pm 0.9$ pA $\tau$ 2: $87.3 \pm 6.5$ ms A2: $4.6 \pm 0.5$ pA (n = 25)	r: $3.2 \pm 0.2$ ms $\tau$ 1: $10.3 \pm 0.8$ ms A1: $38.3 \pm 13.3$ pA $\tau$ 2: $48 \pm 2$ ms A2: $18.9 \pm 7$ pA (n = 5)
CA1 Interneurons	EPSC <sub>AMPA</sub>	r: $0.7 \pm 0.1$ ms $\tau$ : $2.7 \pm 0.3$ ms A: $25.4 \pm 7.8$ pA (n = 5)	r: $1 \pm 0.1$ ms $\tau$ : $2.7 \pm 0.3$ ms A: $17 \pm 2.4$ pA (n = 10)	r: $0.9 \pm 0.2$ ms $\tau$ : $3.8 \pm 0.4$ ms A: $14.7 \pm 1.4$ pA (n = 6)
	EPSC <sub>K<sub>A</sub></sub>	r: $2.7 \pm 0.6$ ms $\tau$ : $11.3 \pm 0.9$ ms A: $15.6 \pm 3.2$ pA (n = 5)	r: $3.3 \pm 0.2$ ms $\tau$ : $10.7 \pm 0.7$ ms A: $9.6 \pm 1.6$ pA (n = 15)	r: $3.8 \pm 0.4$ ms $\tau$ : $16 \pm 4$ ms A: $5.4 \pm 0.7$ pA (n = 4)
	EPSC <sub>AMPA/K<sub>A</sub></sub>	r: $0.9 \pm 0.1$ ms $\tau$ 1: $2.5 \pm 0.2$ ms A1: $27.2 \pm 9$ pA (n = 5) $\tau$ 2: $11.3 \pm 0.9$ ms A2: $12.5 \pm 3.3$ pA (n = 5)	r: $1.2 \pm 0.1$ ms $\tau$ 1: $2.5 \pm 0.2$ ms A1: $11.0 \pm 1.7$ pA $\tau$ : $13.3 \pm 0.9$ ms A2: $7.9 \pm 2.2$ pA (n = 15)	–
CA1 Pyramidal cells	EPSC <sub>AMPA</sub>	r: $2.8 \pm 0.3$ ms $\tau$ : $11.6 \pm 1.4$ ms A: $11 \pm 1.8$ pA (n = 8)	–	–

Abbreviations: A, amplitude; A1, amplitude of the first component of the mixed event; A2, amplitude of the second component of the mixed event; r, rise time;  $\tau$ , decay time constant;  $\tau$ 1, decay time constant of the first component of the mixed event;  $\tau$ 2, decay time constant of the second component of the mixed event.

ms, n = 5 in CA1 interneurons,  $p > 0.05$ ). In addition, in the presence of SYM 2081, we did not observe any significant change in the frequency of the EPSC<sub>AMPA</sub>, as compared with the fast events recorded in control conditions (the frequency was  $0.2 \pm 0.06$  Hz in control conditions and  $0.31 \pm 0.1$  Hz in SYM 2081 in six CA3 pyramidal cells;  $0.2 \pm 0.07$  Hz in control conditions and  $0.25 \pm 0.07$  Hz in SYM 2081 in five CA1 interneurons,  $p > 0.05$ ). Miniature EPSC<sub>mixed</sub> were not recorded in the presence of SYM, indicating that in addition to AMPA receptors, kainate receptors also contributed to their generation (EPSC<sub>mixed</sub> = EPSC<sub>AMPA/kainate</sub>). This experiment also confirmed that EPSC<sub>slow</sub> were mediated by kainate receptors.

The plots of rise times versus decay times and decay times versus amplitudes obtained for the SYM-resistant events revealed a homogeneous group of events that overlapped that of the mEPSC<sub>fast</sub> and not that of the mEPSC<sub>slow</sub> recorded in the absence of SYM (Figure 3). Thus, all AMPA receptor-mediated events (i.e., filtered and nonfiltered) are included in the fast events population (EPSC<sub>AMPA</sub>) and have rapid kinetic properties that differ from the population of slow events mediated by kainate receptors.

Therefore, the quantal release of glutamate activates kainate receptors in both CA3 pyramidal neurons and CA1 interneurons. Glutamatergic events are either pure AMPA or pure kainate receptor-mediated or mixed with both AMPA and kainate receptors participating to their generation. We next determined if electrical activation of glutamatergic inputs could evoke similar EPSCs in

physiological conditions (i.e., in the absence of TTX). We used minimal stimulation to activate single fibers.

#### Minimal Stimulations Evoke Both Pure

#### mEPSC<sub>kainate</sub> and Mixed mEPSC<sub>AMPA/kainate</sub>

Minimal stimulations were performed in the presence of bicuculline and D-APV. In these experiments, the concentration of divalent cations was increased in the perfusion saline (4 mM Ca<sup>2+</sup> and 6 mM Mg<sup>2+</sup>) in order to reduce the level of spontaneous activity and prevent the generation of epileptiform events by bicuculline.

In CA3 pyramidal cells, minimal stimulations of stratum lucidum principally evoked an unitary EPSC with a fall best fitted by a double exponential (Figure 4A; other events were fast, mono decaying EPSCs). Their decay was within the same range as that obtained in mixed mEPSCs (Table 1, Figure 4C). NBQX (1  $\mu$ M) selectively blocked the fast component of the evoked EPSCs (n = 5, Figure 4A), and the slow component was blocked by CNQX (50  $\mu$ M). Therefore, minimal stimulation of glutamatergic afferents evoked a unitary mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> in CA3 pyramidal cells. The amplitudes of the AMPA and kainate components of the unitary mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> were strongly correlated ( $r > 0.85$  for all plots, n = 5; Figure 4B), indicating a coordinated activation of AMPA and kainate receptors by different amounts of glutamate released within the same synaptic cleft (McAllister and Stevens, 2000; Watt et al., 2000).

A similar paradigm could generate pure mEPSC<sub>kainate</sub> in CA1 interneurons. Minimal stimulation of stratum oriens generated either a pure unitary AMPA receptor-medi-

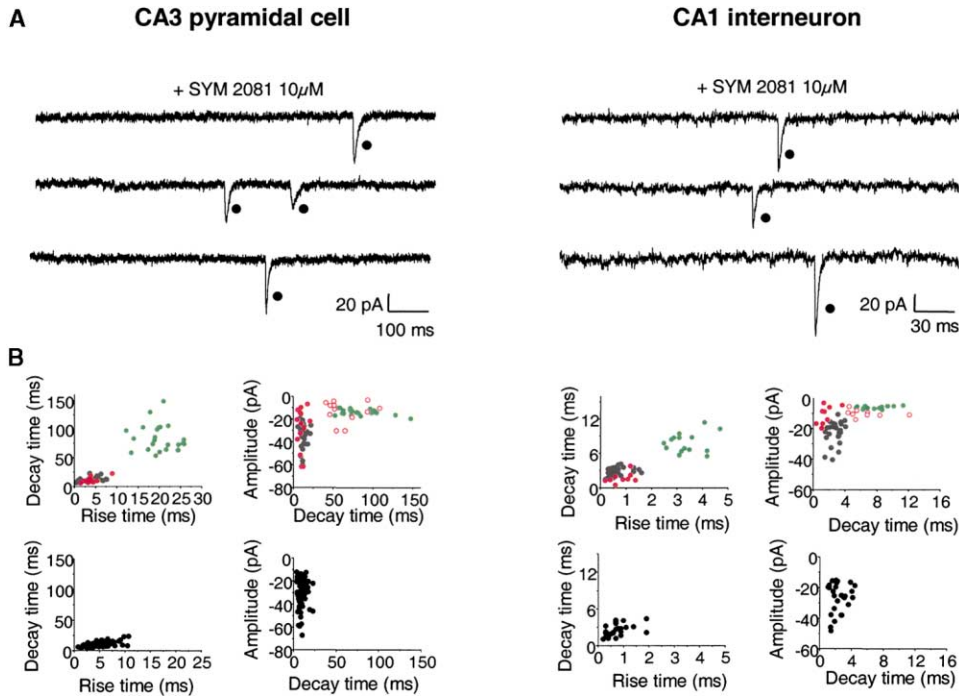


Figure 3. An Antagonist for Kainate Receptors (SYM 2081) Abolishes mEPSC<sub>kainate</sub> and mEPSC<sub>mixed</sub>

(A) Recordings of miniature EPSCs recordings, in the presence of TTX (1  $\mu$ M), bicuculline (10  $\mu$ M), and D-APV (50  $\mu$ M) from a representative CA3 pyramidal cell (left) and a CA1 interneuron (right) show that mEPSC<sub>AMPA</sub> (closed black circle) can be isolated pharmacologically when SYM 2081 (10  $\mu$ M) is added to the saline; Vh: -60 mV. Traces are nonconsecutive.

(B) Scatter plots of the rise time constant (left column) or amplitude (right column) versus decay time constant calculated in mEPSCs recorded from a CA3 pyramidal cell or a CA1 interneuron are shown in the absence (top) or in the presence of SYM 2081 (10  $\mu$ M, bottom). Note that in control conditions, two families of events are clustered in separate areas of the graph, the fast (closed black circle) and the slow events (closed green circle). The decay time constant versus amplitude distributions obtained when plotting the first (closed red circle) and the second (open red circle) components of mixed events overlapped that of the fast (closed black circle) and slow event (closed green circle) families, respectively. In the presence of SYM 2081, only fast events (closed black circle) remain.

ated event or a pure slow EPSC (Figure 5A) with the same kinetics as the mEPSC<sub>kainate</sub> (Table 1, Figure 5B). This slow EPSC was mediated by the activation of kainate receptors since it was NBQX-resistant (1  $\mu$ M) and blocked by CNQX (50  $\mu$ M) (n = 4, Figure 5A). Therefore, the stimulation of single glutamatergic afferents on interneurons can generate evoked currents that are exclusively mediated by kainate receptors.

#### Estimation of the Contribution of Kainate Receptors to Miniature Glutamatergic Activity in the Hippocampus

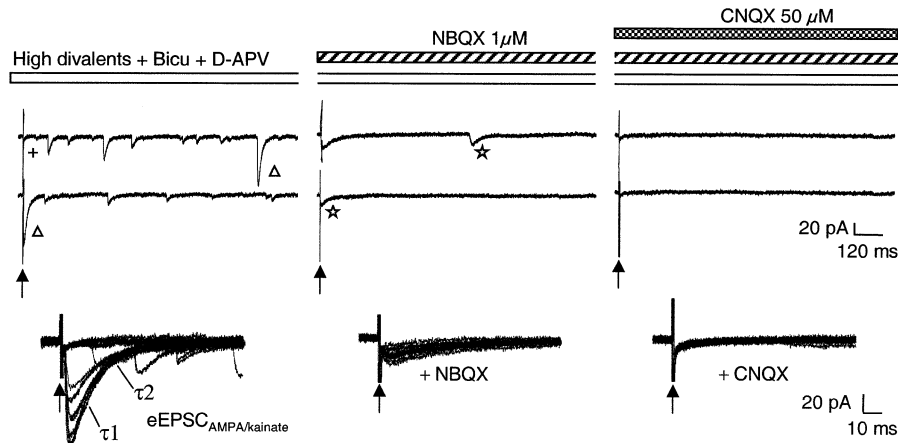
To estimate the total contribution of kainate receptor activation to glutamatergic miniature activity in hippocampal slices, we calculated the frequency of mEPSC<sub>AMPA</sub>, mEPSC<sub>kainate</sub>, and mEPSC<sub>AMPA/kainate</sub> in CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons. To obtain a physiologically relevant estimation, the experiments were performed in the absence of AMPA and kainate receptor antagonists. We relied on the kinetics of the EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>kainate</sub> to perform this task (see Experimental Procedures). EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> were identified by the fact that their decay time constant was best fitted by a double exponential function. Our results show that the contribution of kainate receptors differs in CA1 interneurons and in CA3 pyramidal cells. Interneurons predominantly generated

pure EPSC<sub>kainate</sub> that represented almost half of the total number of events ( $46\% \pm 2\%$ , n = 11). In contrast, in CA3 pyramidal cells, kainate receptors were mostly involved in mixed EPSCs, which represented  $34.2\% \pm 5.3\%$  (n = 25) of the total activity. These observations showed that in the hippocampus, a high percentage of glutamatergic events are mediated by kainate receptors. Both types are absent from CA1 pyramidal neurons, which do not express functional postsynaptic kainate receptors (Bureau et al., 1999; n = 8; data not shown).

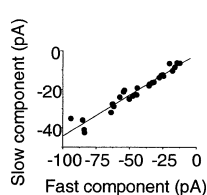
We extended this analysis by calculating the mean percent of charge carried by kainate receptors in digitally averaged mEPSC<sub>AMPA/kainate</sub> and mEPSC<sub>kainate</sub> versus the total charge carried by AMPA and kainate receptors in mEPSCs (Figure 6 and see Experimental Procedures). The mean charge transferred through kainate receptors was greater than that through AMPA receptors in CA3 pyramidal cells ( $73\% \pm 2\%$  of the total charge, n = 25) and CA1 interneurons ( $60\% \pm 1.8\%$ , n = 10). Taking into account the frequency of each type of events and the charge transferred through AMPA or kainate receptors, we could estimate the proportion of current carried by kainate receptors. These results show that kainate receptors are major postsynaptic mediators of miniature glutamatergic transmission in the hippocampus, since more than fifty percent of the total AMPA/kainate receptor-mediated current received by CA3 pyramidal cells

## CA3 pyramidal cell

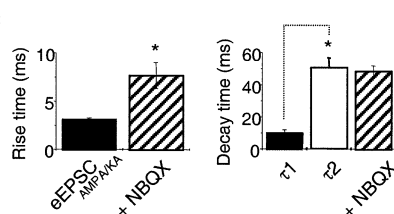
A



B



C



D

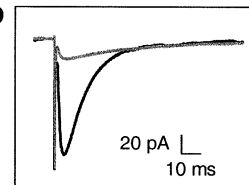


Figure 4. Unitary Mixed EPSCs<sub>AMPA/kainate</sub> Evoked by Minimal Stimulations in CA3 Pyramidal Cells

(A) The top shows representative recordings of spontaneous and minimally evoked EPSCs in a CA3 pyramidal cell in the presence of high-divalent ions (4 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 6 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ), bicuculline (10  $\mu\text{M}$ ), and D-APV (50  $\mu\text{M}$ ) to isolate AMPA/kainate receptor-mediated activity ( $V_h$ :  $-60$  mV). In these conditions, minimal stimulation (arrow) with a glass electrode placed in stratum lucidum evokes either a double decaying EPSC<sub>mixed</sub> (open triangle symbol) or a transmission failure (+). The fast component of the EPSC<sub>mixed</sub> ( $\tau_1$ ) is mediated by AMPA receptors since it is blocked in the presence of NBQX (1  $\mu\text{M}$ , middle); the slow component ( $\tau_2$ ) is mediated by kainate receptors since it is NBQX-resistant (open star symbol, middle) but CNQX-sensitive (right). Note that in both control (left) and NBQX (middle) conditions, sEPSCs with the same time course and amplitude as the evoked EPSC can be detected. The bottom shows superimposed traces of ten consecutively evoked EPSCs in the same pharmacological conditions as above (stimulation at arrow). Tau 1 and tau 2 indicate the first and second component of the mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub>.

(B) Plotted is the amplitude of the slow kainate receptor-mediated component versus the fast AMPA receptor-mediated component of the minimally evoked, double decaying EPSC. Note that there is a tight correlation between the amplitude of the AMPA and kainate receptor-mediated components ( $r = 0.97$ ).

(C) Bar graph of averaged rise times (left) and decay times (right) of the values of minimally evoked EPSC in CA3 pyramidal cells ( $n = 5$ ) show that the second component of the EPSC<sub>mixed</sub> has the same time course as the kainate receptor-mediated component.

(D) Superimposition of the digitally averaged, evoked EPSC shows that the second component of the EPSC<sub>mixed</sub> (black) perfectly fits the decay phase of the EPSC<sub>kainate</sub> evoked in the presence of NBQX (gray).

( $53\% \pm 4.6\%$ ,  $n = 25$ ) and CA1 interneurons ( $64\% \pm 3\%$ ,  $n = 10$ ) was generated by kainate receptors (Figure 6).

### Spontaneous EPSC<sub>AMPA</sub>, Pure EPSC<sub>kainate</sub>, and Mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> in CA3 Pyramidal Cells and CA1 Interneurons

To ensure that pure EPSC<sub>AMPA</sub>, pure EPSC<sub>kainate</sub>, and mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> could be observed in physiological conditions, spontaneous EPSCs (sEPSCs) were recorded in the absence of GABA, AMPA, and NMDA receptor antagonists. To isolate non-NMDA receptor-mediated events, spontaneous EPSCs were recorded at the reversal potential for GABAergic currents ( $V_h = -70$  mV). At this potential, the current mediated by NMDA receptors is nearly abolished by the  $\text{Mg}^{2+}$  block (Ascher and Nowak, 1988).

In CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons, the population of non-NMDA sEPSCs was clearly heteroge-

neous since, in addition to fast sEPSCs, we observed events with a slow time course or a fall best fitted by a double exponential (Figure 7). The spontaneous fast, slow, and double decaying EPSCs had kinetics within the same range as that of mEPSC<sub>AMPA</sub>, mEPSC<sub>kainate</sub>, and mEPSC<sub>AMPA/kainate</sub>, respectively (see Table 1 for values). As previously described for miniature EPSCs, part of these events were mediated by kainate receptors since they were resistant to the AMPA receptor antagonist GYKI 52466 (100  $\mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ; Figure 7), fully blocked by the mixed AMPA/kainate receptor antagonist CNQX (50  $\mu\text{M}$ ; data not shown) and had slow kinetics ( $r$ :  $12.2 \pm 0.6$  ms,  $\tau$ :  $101.8 \pm 1$  ms in five CA3 pyramidal cells and  $r$ :  $2.7 \pm 0.05$  ms,  $\tau$ :  $12.4 \pm 0.6$  ms in five CA1 interneurons), as compared to fast AMPA receptor-mediated events (Table 1). In CA1 pyramidal neurons, we observed a homogeneous population of fast EPSCs (Figure 7, Table 1) that were only mediated by AMPA receptors since they were fully blocked by the selective AMPA



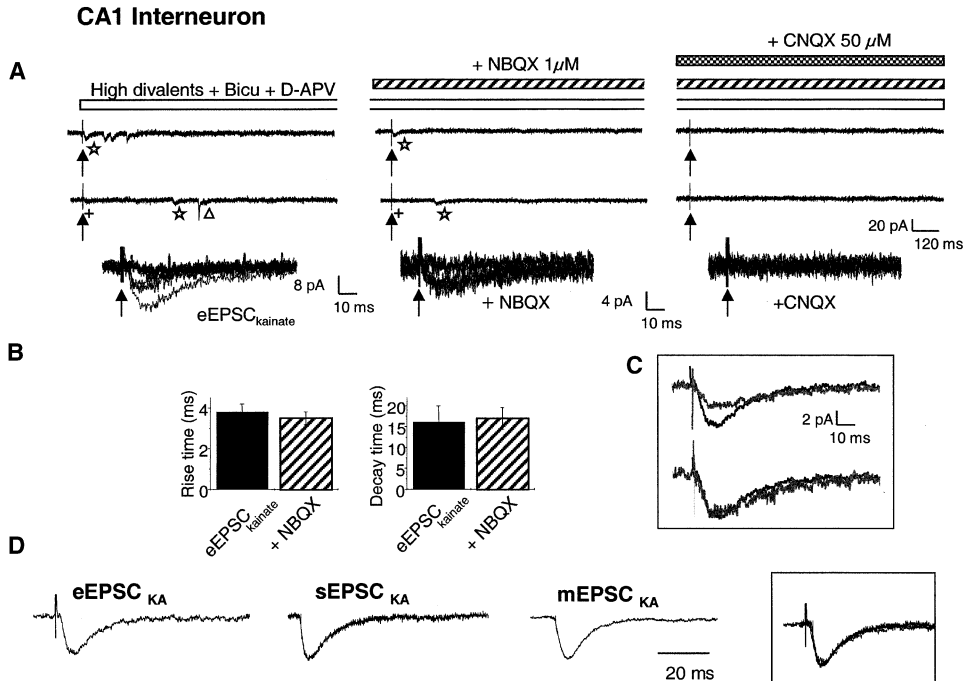


Figure 5. Unitary Pure EPSCs<sub>kainate</sub> Evoked by Minimal Stimulations in CA1 Stratum Oriens Interneurons

(A) The top shows representative recordings of spontaneous and minimally evoked EPSCs in a CA1 stratum oriens in the presence of high-divalent ions (4 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 6 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ), bicuculline (10  $\mu\text{M}$ ), and D-APV (50  $\mu\text{M}$ ) to isolate AMPA/kainate receptors-mediated activity ( $V_h$ : -60 mV). In these conditions, minimal stimulation (arrow) with a glass electrode placed close to the cell body evokes either a slowly decaying EPSC<sub>kainate</sub> (open star symbol) or a transmission failure (+); the evoked EPSC<sub>kainate</sub> is NBQX-resistant (open star symbol, middle) but CNQX-sensitive (right). Note that both in control (left) and NBQX (middle) conditions, sEPSCs with the same time course and amplitude as the evoked EPSC can be detected. The bottom shows superimposed traces of ten consecutively evoked EPSCs in the same pharmacological conditions as above (stimulation at arrow).

(B) A bar graph depicts averaged rise times (left) and decay times (right) values of minimally evoked EPSCs in CA1 interneurons ( $n = 4$ ) showing that the time course of the minimally evoked EPSC<sub>kainate</sub> is unaltered in the presence of NBQX (1  $\mu\text{M}$ ).

(C) Superimposition of the digitally averaged, evoked EPSCs shows that NBQX (gray) decreases the amplitude (top), but does not alter the time course (bottom scaled traces), of the EPSC<sub>kainate</sub> evoked in control conditions (black).

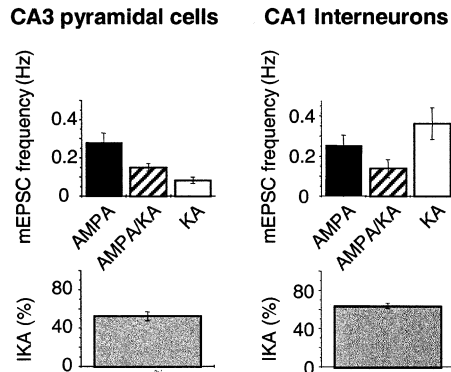
(D) Evoked, spontaneous, and miniature EPSC<sub>kainate</sub> (digital averages) in a CA1 interneuron perfectly overlapped (superimposition in the insert) are shown.

receptor antagonist GYKI 52466 (100  $\mu\text{M}$ ,  $n = 5$ ; Figure 7). Therefore, kainate receptors contribute to ongoing activity of hippocampal glutamatergic synapses in CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons. The contribution of kainate receptors to spontaneous glutamatergic activity was difficult to estimate because of the frequent overlap of sEPSCs that precluded their identification. However, an estimation was possible in five stratum oriens interneurons that showed a low level of spontaneous glutamatergic activity. In these neurons, sEPSC<sub>kainate</sub> represented  $31\% \pm 11\%$  of the events, sEPSC<sub>AMPA/kainate</sub>  $11\% \pm 3\%$ , and sEPSC<sub>AMPA</sub>  $57\% \pm 13\%$  ( $n = 5$ ).

#### Mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> Are Generated at Mossy Fiber Synapses onto CA3 Pyramidal Cells

The sources of glutamatergic innervation on CA3 pyramidal cells have been extensively defined as being opposed to those on stratum oriens interneurons. CA3 pyramidal cells receive glutamatergic inputs from three well-segregated major pathways: the mossy fiber pathway from dentate granular cells, the associational-commissural pathway from other CA3 pyramidal cells, and the perforant pathway from the entorhinal cortex.

Among these pathways, several observations suggest that kainate receptors are specifically associated with mossy fibers (Ben Ari and Cossart, 2000; Castillo et al., 1997; Frerking and Nicoll, 2000; Lerma et al., 2001; Mulle et al., 1998; Represa et al., 1987). This hypothesis was tested using organotypic slice cultures (Stoppini et al., 1991). In this preparation, the mossy fibers can be eliminated by removal of the dentate gyrus and the consequences tested several days later. CA3 pyramidal cells were recorded after 7 days in culture to ensure the complete degeneration of the mossy fiber pathway (Qin et al., 2001). We relied on dynorphin immunoreactivity, a selective marker of mossy fiber synapses (Henze et al., 1997), to establish the loss of mossy fibers and on  $\alpha\text{N-neuN}$  immunoreactivity to assess the absence of granular cells (Figure 8A). In control slice cultures (after 1 or 2 weeks in culture) mEPSC<sub>AMPA</sub> ( $r$ :  $2.8 \pm 0.26$  ms and  $\tau$ :  $13.5 \pm 1.4$  ms,  $n = 11$ ) and mEPSC<sub>AMPA/kainate</sub> ( $r$ :  $2.7 \pm 0.19$  ms,  $\tau_1$ :  $11 \pm 1$  ms, and  $\tau_2$ :  $58.2 \pm 7.2$  ms,  $n = 11$ ) were recorded at frequencies similar to those in acute slices. However, mEPSC<sub>kainate</sub> ( $r$ :  $15 \pm 2.2$  ms and  $\tau$ :  $62.5 \pm 24$  ms) were less frequent than in acute slices (mean frequency:  $0.01 \pm 0.001$  Hz,  $n = 11$ ;  $p < 0.05$ ; Figure 8),



**Figure 6.** Contribution of Kainate Receptors to Miniature Glutamatergic Activity in CA3 Pyramidal Cells and CA1 Interneurons

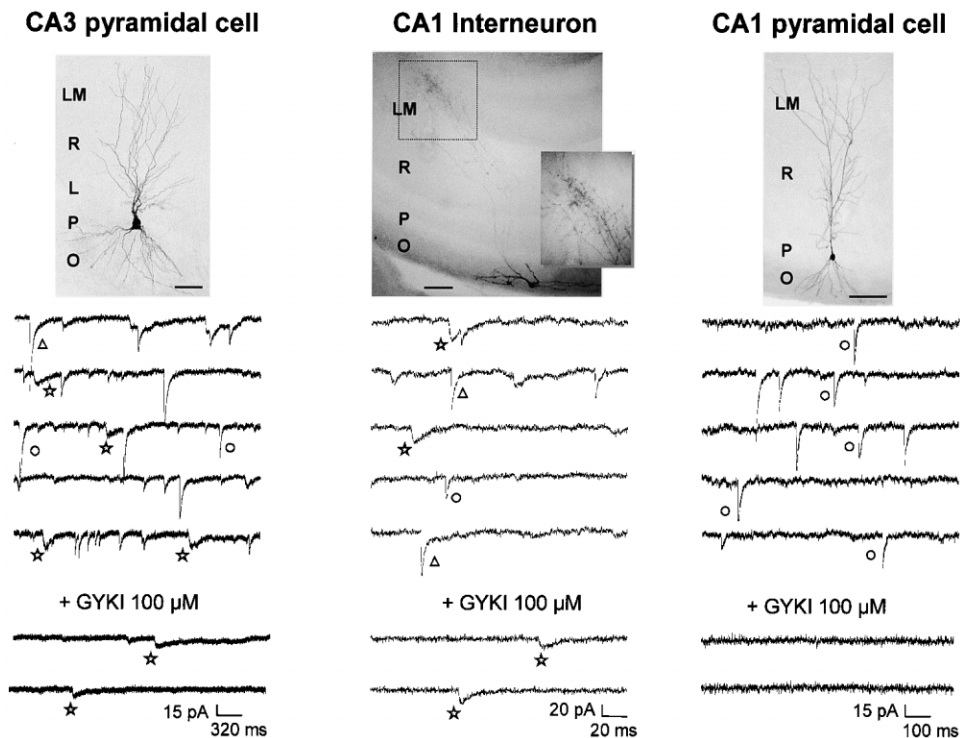
The top depicts histograms of averaged frequencies of mEPSC<sub>AMPA</sub>, mEPSC<sub>AMPA/kainate</sub>, and mEPSC<sub>kainate</sub> in CA3 pyramidal cells (left,  $n = 25$ ) and CA1 interneurons (right,  $n = 15$ ). The bottom shows mean percentage of miniature current mediated by postsynaptic kainate receptors (see Experimental Procedures) in both cell types ( $n = 25$  pyramidal cells and 15 interneurons).

possibly because of the lack of a synaptic input in the preparation, thus precluding a quantitative estimation of the source of the pure EPSC<sub>kainate</sub>. In slices lacking the

mossy fiber input pathway, only fast mEPSC ( $r: 2 \pm 0.27$  ms and  $\tau: 10.2 \pm 1.2$  ms, mean frequency =  $0.24 \pm 0.08$ ,  $n = 11$ ) were detected in the presence of bicuculline ( $10 \mu\text{M}$ ), D-APV ( $50 \mu\text{M}$ ), and TTX ( $0.3\text{--}1 \mu\text{M}$ ) (Figure 8B). These mEPSCs were fully blocked by the addition of NBQX ( $1 \mu\text{M}$ ) or GYKI 52466 ( $100 \mu\text{M}$ ;  $n = 11$ ), showing that they were mediated by AMPA receptors. We conclude that the mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> are of mossy fiber origin. Further studies are required to determine the synaptic sources of the synaptic currents with a kainate components on CA1 interneurons.

## Discussion

Our results show that kainate receptors can be activated by the quantal release of glutamate to generate pure unitary EPSCs or mixed unitary EPSCs when coactivated with AMPA receptors in the hippocampus. The relatively fast kinetics of pure kainate EPSCs in CA1 interneurons—not observed previously in central neurons—indicates that kainate receptors are localized in the synaptic cleft either with AMPA receptors or in pure kainate synapses. Furthermore, kainate receptors are major actors in the generation of ongoing basal glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus: they provide as much as of half the total glutamatergic



**Figure 7.** Kinetic Heterogeneity of Spontaneous EPSCs in CA1 Interneurons and CA3, But Not CA1, Pyramidal Cells

Representative sEPSCs recordings ( $V_h = -70$  mV) from a CA3 pyramidal cell, a CA1 stratum oriens interneuron, and a CA1 pyramidal cell are shown. Note that in both the CA3 pyramidal cell and the CA1 interneuron, but not in the CA1 pyramidal neuron, three types of sEPSCs can be distinguished based on the time course of their decay: fast (open black circle), slow (open star symbol), and mixed EPSCs with a double decaying phase (open triangle symbol). Only events with slow kinetics remain in the presence of GYKI 52466 ( $100 \mu\text{M}$ , open star symbol, bottom traces). Photomicrographs (top) illustrate the biocytin-filled recorded neurons. The interneuron had a cell body in stratum oriens and an axon innervating stratum lacunosum moleculare (O-LM interneuron; see insert magnification  $4\times$ ). Abbreviations: O, stratum oriens; P, stratum pyramidale; L, stratum lucidum; R, stratum radiatum; LM, stratum lacunosum moleculare. Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ .



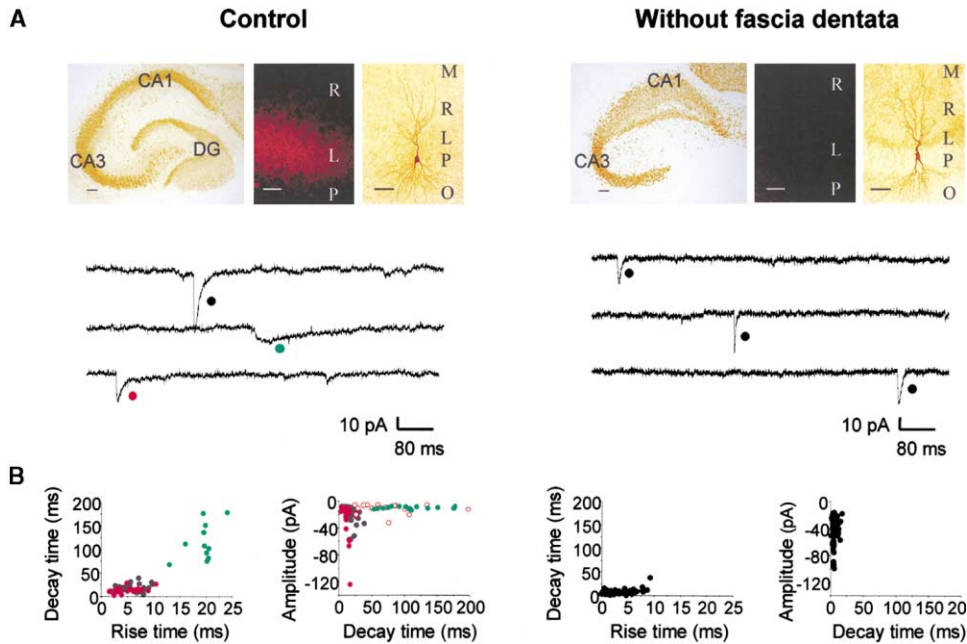


Figure 8. Mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> Are Generated in Mossy Fiber Synapses in CA3 Pyramidal Cells

(A) The top shows organotypic slice cultures control and after removal of fascia dentata, labeled with  $\alpha$ NeuN (left) or dynorphin (middle) antibodies to selectively stain neuronal cell bodies and mossy fibers terminals, respectively. Right photomicrograph illustrates CA3 biocytin-filled recorded pyramidal cells. Note that the absence of fascia dentata (assessed by the absence of staining with  $\alpha$ NeuN antibody) was associated with a loss of mossy fiber terminals, which is depicted by the lack of dynorphin immunostaining. However, CA3 pyramidal cells displayed a normal morphology. The bottom illustrates miniature EPSCs recordings in the presence of TTX (1  $\mu$ M), bicuculline (10  $\mu$ M), and D-APV (50  $\mu$ M) from a CA3 pyramidal cell in control organotypic slice culture (left) or culture lacking the fascia dentata (right). Note that in control conditions in this CA3 pyramidal cell, three types of mEPSCs can be distinguished based on the time course of their decay: fast (closed black circle), slow (closed green circle), and mixed EPSCs with a double decaying phase (closed red circle). Without the fascia dentata, only mEPSC<sub>AMPA</sub> (closed black circle) can be recorded.

(B) Scatter plots of the rise time constant (left column) or amplitude (right column) versus decay time constant calculated in mEPSCs recorded from a CA3 pyramidal cell in control organotypic slice cultures and in slice cultures lacking fascia dentata. Note that in control conditions, two families of events are clustered in separate areas of the graph are shown: the fast (closed black circle) and slow events (closed green circle). The decay time constant versus amplitude distributions obtained when plotting the first (closed red circle) and the second (open red circle) components of mixed events overlapped that of the fast (closed black circle) and slow event (closed green circle) families, respectively. In slice cultures lacking fascia dentata, only fast events (closed black circle) remained.

currents recorded in interneurons. Finally, our data provide direct evidence that, in CA3 pyramidal cells, AMPA and kainate receptors are most likely colocalized in individual mossy fiber synapses.

#### Pure EPSC<sub>kainate</sub> and Mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> in CA3 Pyramidal Cells and CA1 Stratum Oriens Interneurons

Relying on their pharmacological profile and kinetic properties, we have identified three types of miniature, spontaneous, and evoked glutamatergic currents in CA3 pyramidal cells and CA1 stratum oriens interneurons: pure EPSC<sub>AMPA</sub>, mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub>, and pure EPSC<sub>kainate</sub>. As expected, the fastest events were mediated by AMPA receptors (EPSC<sub>AMPA</sub>), since they were fully blocked by AMPA receptor antagonists (GYKI and NBQX). In contrast, slow events were mediated by kainate receptors (EPSC<sub>kainate</sub>), since they were resistant to AMPA receptor antagonists (GYKI and NBQX) and blocked by a selective antagonist for kainate receptors (SYM 2081) and a mixed AMPA/kainate receptor antagonist (CNQX). In addition, there is a population of events with a rapid rise time and a double exponential decay time that are

generated by the coactivation of AMPA and kainate receptors (EPSC<sub>AMPA/kainate</sub>) since: (1) the double decaying EPSCs are sensitive to both AMPA (GYKI and NBQX) and kainate (SYM2081) receptor antagonists and fully blocked by a mixed AMPA/kainate receptor antagonist (CNQX). (2) The averaged decay times of the first and second components of these events are identical to the averaged decay times of mEPSC<sub>AMPA</sub> and mEPSC<sub>kainate</sub>, respectively. (3) The plots of amplitude versus decay time for the first and second component of these events are segregated in two regions of the graph that fully match the same plots obtained for mEPSC<sub>AMPA</sub> and mEPSC<sub>kainate</sub>, respectively. (4) Minimal stimulation experiments show that the slow component of the evoked mixed EPSC is resistant to NBQX and fully blocked by CNQX. (5) The experiments using minimal stimulation suggest that the AMPA and kainate receptors mediating the evoked EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> are likely to be located within the same synaptic cleft since there was a tight correlation between the amplitudes of AMPA and kainate receptors mediated components of the evoked EPSC (eEPSC) at each stimulation trial. Thus, in both CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons, we can isolate

(in addition to the classically described fast mEPSC<sub>AMPA</sub>) pure mEPSC<sub>kainate</sub> with a slower kinetics and mixed mEPSC<sub>AMPA/kainate</sub> with a fast rise time and a double decay.

### Fast Kinetics of Unitary Kainate Receptor-Mediated Synaptic Currents in Interneurons

In our experiments, kainate receptor-mediated currents recorded in pure EPSC<sub>kainate</sub> and mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> were characterized by their slow time course and small amplitude when compared to AMPA receptor-mediated ones in CA1 interneurons and CA3 pyramidal cells. However, the time course of the kainate receptor-mediated current differed among cell types. In CA3 pyramidal cells, the decay time for kainate receptor-mediated currents ranged between 50 and 150 ms whereas in CA1 interneurons, it ranged between 5 and 15 ms.

Previous estimations of the decay kinetics of kainate receptor-mediated EPSCs relied primarily on values obtained by bulk stimulation protocols that ranged between 30 (Cossart et al., 1998; Li et al., 1999) and 100 (Castillo et al., 1997) ms. The pure spontaneous EPSC<sub>kainate</sub> recorded in developing cortical neurons also had a circa 200 ms decay time constant (Kidd and Isaac, 1999). To the best of our knowledge, EPSCs mediated by kainate receptors with a millisecond decay time constant have only been reported in "off" bipolar cells (DeVries, 2000). Considering the time course of EPSC<sub>kainate</sub> in CA1 interneurons, we now show that in the hippocampus as in the retina, synaptic kainate receptor-mediated currents have a time course as fast as that measured upon glutamate application for heterologously expressed kainate receptors (Cui and Mayer, 1999; Swanson and Heinemann, 1998). Therefore, at least in interneurons, the kinetics of kainate receptor-mediated currents is most likely due to intrinsic properties of kainate receptors rather than to the diffusion of glutamate or other factors (see Frerking and Nicoll, 2000, and Lerma et al., 2001, for a review). In contrast, in CA3 pyramidal cells, the kinetics of EPSC<sub>kainate</sub> is slower than in CA1 interneurons and heterologous expression systems but is similar to that of the evoked EPSC<sub>kainate</sub> (Castillo et al., 1997; Vignes and Collingridge, 1997). The origin of such difference could be the synaptic kainate receptor subunit composition (Cossart et al., 1998; Cui and Mayer, 1999; Mülle et al., 1998, 2000), intracellular signals, or accessory proteins (Garcia et al., 1998). Another hypothesis is that this difference could be due to the architectonic properties of CA3 pyramidal cells, such as the size of the cells, the number of neurites, and the proportion of dendritic spines that have been shown to alter the time course of synaptic events (Livsey and Vicini, 1992). In keeping with this, the EPSC<sub>AMPA</sub> is also twice as slow in CA3 than in CA1 pyramidal cells (Table 1). Future studies will have to explain these differences.

Another characteristic property of kainate receptor-mediated currents is their small amplitude relative to AMPA receptor-mediated currents (Frerking and Nicoll, 2000; Lerma et al., 2001). This is particularly clear in mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub>, as shown by the plots of mEPSCs amplitude versus decay time constant. Thus, the small peak amplitude of kainate receptor-mediated currents seems to be a general property. This could be due to a small number of kainate receptors opened at the peak

of the EPSC (Frerking et al., 1998) to a smaller, single-channel conductance (Swanson et al., 1996) or to different properties of glutamate-releasing sites. However, the latter explanation is unlikely, since in unitary mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub>, the amplitude of the kainate component is always smaller than the AMPA one. Nevertheless, it is important to emphasize that in spite of their small amplitude, the charge carried by kainate receptor-mediated currents is greater in CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons than that of AMPA receptors due to their slower time course.

### Kainate Receptors Provide a Substantial Proportion of the EPSCs Recorded in CA3 Pyramidal Cells and CA1 Stratum Oriens Interneurons

We estimated the contribution of kainate receptors to basal glutamatergic activity in two ways: first, as the proportion of events involving the activation of kainate receptors and second, as the percentage of current resulting from their activation. Our analysis relied on the kinetics of the three types of events in physiological conditions (i.e., without blockers). One important condition to validate this conclusion is to preclude the possibility that because of inadequate clamp conditions—particularly at distal dendritic sites—some small EPSC<sub>kainate</sub> would be, in fact, filtered EPSC<sub>AMPA</sub>. The following observations cannot be reconciled with this possibility. (1) In CA1 pyramidal neurons that are devoid of kainate receptors and where EPSCs are mediated only by AMPA receptors, despite the presence of distally generated EPSC<sub>AMPA</sub>, there were no events with as slow kinetics as EPSC<sub>kainate</sub>. (2) Single exponential fast AMPA and slow events were clustered in two separate regions of the graphs plotting mEPSCs rise times versus decay times. Similar plots of distally and locally generated events mediated by the same receptor type do not cluster in two discrete regions but, rather, tend to form a continuum (Bekkers and Stevens, 1996). (3) The slowest mEPSC<sub>AMPA</sub>-recorded when kainate receptors were blocked by SYM—were still faster than the kinetics of the fastest mEPSC<sub>kainate</sub> recorded in GYKI. This enabled us to define a "kinetic threshold" to identify kainate receptor-mediated events. (4) The charge underlying each EPSC, a parameter classically considered not to be affected by electrotonic filtering (Bekkers and Stevens, 1996; Magee and Cook, 2000), was significantly different between EPSC<sub>AMPA</sub> and the EPSC<sub>kainate</sub>. (5) Selective lesion of the mossy fibers eliminates the slow component of the mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> without affecting pure EPSC<sub>AMPA</sub>. This is important as the mossy fiber synapses are close to the cell body, and the voltage clamp conditions have been shown to be adequate for that synapse (Henze et al., 1997). Our estimation of the contribution of the EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> could be biased because of a chance probability that pure fast and slow events coincide to generate a mixed event. However, this can be excluded because the frequency of the pure EPSC<sub>kainate</sub> is lower in CA3 pyramidal neurons than the mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub>. Also, the frequency of miniatures EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>kainate</sub> is very low and the likelihood that two events coincide during an EPSC is negligible; in keeping with this, we never detected a mixed event beginning with an EPSC<sub>kainate</sub>. Finally, this possibility can-

not be reconciled with the loss of the EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> following lesions of the mossy fibers.

Frequency analysis of the three types of miniature events revealed that around 45% of miniature events involved kainate receptors in CA3 pyramidal cells and 65% in CA1 interneurons. Taking into account the frequency of each type of event and the charge carried respectively by AMPA and kainate receptor-mediated currents, we estimated that in our experimental conditions, half of the glutamatergic current is generated by activation of kainate receptors in CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons. Therefore, we conclude that in cells that express functional postsynaptic kainate receptors, these receptors substantially participate in basal glutamatergic activity. These results are quite unexpected since previous reports have shown that kainate receptor-mediated responses were difficult to detect (Frerking and Nicoll, 2000). However, it is important to stress that in these studies, the kainate receptor-mediated responses were isolated in the presence of the AMPA receptor antagonist GYKI, a drug that also blocks more than half of the kainate response (Frerking et al., 1998, and present data).

Since each type of unitary EPSC had a very characteristic kinetic signature (Table 1), we were also able to isolate spontaneous EPSC<sub>kainate</sub> and EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> in physiological conditions. The three types of events (sEPSC<sub>AMPA</sub>, sEPSC<sub>kainate</sub>, and sEPSC<sub>AMPA/kainate</sub>) were present in the spontaneous glutamatergic activity of CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons. However, we could not measure the respective frequency of each type of event due to the high level of glutamatergic activity in the absence of TTX. Nevertheless, our results show that kainate receptors provide a substantial proportion of the glutamatergic currents in adult hippocampal neurons. Thus, the participation of these receptors is not restricted to immature neurons, as suggested on the basis of responses evoked by bulk stimulation in the thalamo-cortical system (Kidd and Isaac, 1999).

#### EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> in CA3 Pyramidal Cells Are Generated at Mossy Fiber Synapses

The presence of EPSC<sub>AMPA</sub>, EPSC<sub>kainate</sub>, and mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> in the hippocampus (with different temporal signatures) adds to the diversity of glutamatergic synaptic transmission. Since the hippocampus integrates information from different structures, this diversity could enable neurons to discriminate between these inputs, as in the retina (DeVries, 2000). In this case, it must be possible to assign to each type of event a specific presynaptic source. Kainate receptors expressed on CA3 pyramidal cells are classically associated to the mossy fiber pathway (Represa et al., 1987; Castillo et al., 1997; Petralia et al., 1994). The selective elimination of mixed EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> by the removal of granule cells from organotypic slices provides direct evidence that these events are indeed generated at mossy fiber synapses. Future studies are required to identify the sources of the pure EPSC<sub>kainate</sub>, in particular in interneurons, considering their clearly major role in glutamatergic transmission in these cells. It will be also interesting to determine whether the three types of EPSCs are differentially affected, in particular in relation

to the epilepsies in which hippocampal kainate receptors play an important role (Ben-Ari, 1985; Ben-Ari and Cossart, 2000).

In conclusion, our results indicate that in the hippocampus, there is a highly significant and diversified contribution of kainate receptors to glutamatergic synaptic transmission. Clearly, glutamatergic synapses are mediated by both AMPA and kainate receptors in ongoing conditions of activation, in addition to NMDA receptors that will also be activated in more depolarised conditions. Interestingly, the two cell types in which kainate receptors contribute to basal glutamatergic neurotransmission (i.e., CA3 pyramidal cells and CA1 interneurons) are critically involved in the generation and control of rhythmic activities (McBain and Fisahn, 2001; Miles and Wong, 1983). Therefore, kainate receptor-mediated events, with their relatively slow kinetics (as compared to EPSC<sub>AMPA</sub>), might play an important role in synchronizing the network through the temporal summation of afferent inputs. Because the kinetics of kainate receptor-mediated currents is faster in interneurons than in pyramidal cells, the frequency pattern of afferent synaptic activity necessary for temporal summation should be faster in interneurons than in pyramidal cells (Traub et al., 2000).

#### Experimental Procedures

##### Electrophysiology

Transverse hippocampal slices (400  $\mu$ m thick) were obtained from 12- to 21-day-old male Wistar rats. Rats were decapitated under deep anesthesia with chloral hydrate (i.p., 350 mg/kg) and hippocampal slices were cut using a chopper (McIlwain, U.S.A.) or a Leica VT1000S tissue slicer. Slices were superfused continuously with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 126 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glucose and aerated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>.

After rest (>1 hr), slices were individually transferred to a recording chamber maintained at 30–32°C and continuously perfused with oxygenated ACSF. Whole-cell recordings of spontaneous and miniature glutamatergic postsynaptic currents (PSCs) were obtained using tight-seal electrodes (3–10 M $\Omega$ ) filled with an internal solution containing: 135 mM Cs-gluconate, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.5% biocytin (pH 7.25), complemented in some experiments with 2 mM MgATP and 0.4 mM NaGTP. No differences were observed between both internal solutions.

The pyramidal cell layer was visualized with a binocular magnifying glass (Leica MZ6), while interneurons were visually identified with an IR-DIC microscope (Leica DM LFS) through a 40 $\times$  water immersion objective. During recordings, neurons were filled passively with biocytin for post hoc identification (see Morphology). Miniature recordings were performed at  $-60$  mV and spontaneous recordings at the reversal potential for GABAergic PSCs ( $-70$  mV). Minimal stimulations were performed via a glass electrode filled with saline placed near the cell body (CA3 stratum lucidum or CA1 stratum oriens). The stimulus intensity and duration were adjusted to observe failures of synaptic transmission (between 40–80  $\mu$ A and 20–30  $\mu$ s).

Signals were fed to an EPC9 (HEKA, Heidelberg, Germany) or an Axopatch 2B amplifier (Axon Instruments, USA), filtered (2 kHz), digitized (10 kHz) with a Labmaster interface card (Axon Instruments) to a personal computer, and analyzed with MiniAnalysis 5.1 program (Synaptosoft, USA). Access resistance ranged between 10–20 M $\Omega$ , and the results were discarded if it changed by more than 20%.

##### Analysis

Each single event in each recorded cell was fully characterized by the following parameters: rise time (10%–90%), amplitude, and decay time constants were calculated using MiniAnalysis 5.1. The

baseline noise ranged between 3–5 pA, and an amplitude threshold of 2 pA more than the baseline noise was used for event detection. The false positive and false negative events represented less than 5% of the total events. To discriminate between each category of events in the absence of AMPA or kainate receptor antagonists, the following procedure was followed: all the events of each cell were individually fitted using the MiniAnalysis program 5.1. First, the mixed AMPA/kainate receptor-mediated events were identified as events with a decay time constant best fitted by a double exponential. The standard deviation given by the fit was used to determine whether one or two exponentials best fitted the decays. Then, to separate the mono exponentially fitted fast AMPA from the slow kainate receptor-mediated events, a “kinetic limit” was determined. The mono exponential decay times versus rise times were plotted for all the events in each cell. From this graph (in which fast AMPA and slow kainate receptor-mediated events were completely segregated in two distinct areas), the kinetic limit was determined. Using this method, we observed that fast AMPA and slow kainate receptor-mediated events could be easily differentiated on the basis of their decay time, as previously described (Kidd and Isaac, 1999). The limit of the decay time to separate fast AMPA and slow kainate receptor-mediated events was around 50 ms for CA3 pyramidal cells (i.e., events with a decay time slower than 50 ms were considered as kainate receptor-mediated) and 5 ms for CA1 interneurons.

The charge transfer through the AMPA and kainate receptor-mediated EPSCs ( $Q_{\text{AMPA}}[\text{EPSC}_{\text{AMPA}}]$  and  $Q_{\text{kainate}}[\text{EPSC}_{\text{kainate}}]$ , respectively) was given by the area underlying the digitally averaged traces. The charge transfer through the AMPA and kainate receptor-mediated components of the dual component EPSC<sub>AMPA/kainate</sub> ( $Q_{\text{AMPA}}[\text{EPSC}_{\text{AMPA/kainate}}]$  and  $Q_{\text{kainate}}[\text{EPSC}_{\text{AMPA/kainate}}]$ , respectively) were estimated by calculating the product of the decay and the current at peak obtained from the exponential fits. The current mediated by AMPA or kainate receptor was the product of the total charge carried by AMPA or kainate receptor-mediated currents in each event type and the frequency of each event type:  $I_{\text{AMPA}} = Q_{\text{AMPA}}[\text{EPSC}_{\text{AMPA}}] \times f[\text{EPSC}_{\text{AMPA}}] + Q_{\text{AMPA}}[\text{EPSC}_{\text{AMPA/kainate}}] \times f[\text{EPSC}_{\text{AMPA/kainate}}]$ ;  $I_{\text{kainate}} = Q_{\text{kainate}}[\text{EPSC}_{\text{kainate}}] \times f[\text{EPSC}_{\text{kainate}}] + Q_{\text{kainate}}[\text{EPSC}_{\text{AMPA/kainate}}] \times f[\text{EPSC}_{\text{AMPA/kainate}}]$ . All the experimental values are given as means  $\pm$  SEM. Student's *t* test was used for statistical comparisons except when otherwise indicated ( $p < 0.05$  was considered significant).

## Organotypic Slice Culture

### Procedure

Organotypic slices were prepared from hippocampi on postnatal day (P)10 male Wistar rats, according to the procedure described by Stoppini et al. (1991) with minor changes. Briefly, rats were decapitated under deep anesthesia with chloral hydrate (i.p., 350 mg/kg). All the next steps were performed under a laminar flow hood, using sterile techniques. Following the removal of the brain, the hippocampi were isolated, and hippocampal sections 400  $\mu\text{m}$  thick were prepared using a chopper (McIlwain, USA) and collected in a PBS solution supplemented with 0.5% D-glucose. To obtain lesioned slices, the dentate gyrus was surgically removed under a binocular glass. Slices were kept at 4°C for 30 min in PBS-glucose and then placed onto Millicell-CM culture inserts (0.4  $\mu\text{m}$ ; Millipore; three slices per insert). The inserts were placed into six-well culture plates with 1 ml medium of the following composition: MEM (Sigma) supplemented with: 25 mM Glucose, 30 mM HEPES, 5 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 3 mM L-Glutamine, 0.5 mM L-Ascorbic Acid, 2 mM  $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , and 1 mg/l insulin (pH 7.25–7.29 with horse serum [20%]). Slices were maintained for 1–2 weeks in a cell culture incubator at 37°C in an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . This was done to ensure a complete degeneration of the mossy fibers following removal of the fascia dentata. The medium was changed three times per week.

### Immunocytochemistry

Organotypic slices were fixed by immersion for 1 hr at room temperature in 4% paraformaldehyde in PBS and incubated for 30 min in methanol containing 0.4%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . After rinsing and a 30 min incubation in 2% normal goat serum in PBS containing 0.3% Triton X-100, the tissues were incubated overnight at 4°C with the monoclonal primary antibody  $\alpha\text{NeuN}$  (1:10,000, Sigma) or the polyclonal anti-dynorphin (1:5000, Peninsula) in the same solution. Antigen-antibody complex were revealed using the avidin-biotin-peroxydase procedure (ABC, Vectastain Elite; Vector Labs).

## Morphology

Slices were fixed overnight at 4°C in a solution containing 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4). After fixation, slices were rinsed in PBS, cryoprotected in sucrose, and quickly frozen on dry ice. To neutralize endogenous peroxidase, slices were pretreated for 30 min in 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . After several rinses in saline phosphate buffer (0.1 M PBS) (pH 7.4), slices were incubated for 24 hr at room temperature in 1:100 avidin-biotinylated peroxidase complex (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) diluted in PBS containing 0.3% Triton X-100. After 30 min rinses in PBS, slices were processed with 0.06% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma, St. Louis, MO) and 0.006%  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluted in PBS.

## Chemicals

CNQX, D-APV, GYKI 52466, NBQX, and biocytin were obtained from Sigma, TTX from Latexan, and SYM 2081 from Fisher Bioblock. GYKI 53655 was kindly provided by Dr. Leander (Lilly Research Centre, Ltd.). All of the compounds used for organotypic slice cultures were purchased from Sigma.

## Acknowledgments

We thank I. Jorquera and N. Ferrand for technical assistance and Drs. A. Represa, C. Bernard, R. Khazipov, J.-L. Gaïarsa, and L. Aniksztejn for helpful comments. R.C. is supported by a grant of the French Ligue against Epilepsy and R.T. by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Financial support is also acknowledged from the FRM.

Received: October 19, 2001

Revised: May 29, 2002

## References

- Ascher, P., and Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J. Physiol. (Lond.)* 399, 247–266.
- Bekkers, J.M., and Stevens, C.F. (1996). Cable properties of cultured hippocampal neurons determined from sucrose-evoked miniature EPSCs. *J. Neurophysiol.* 75, 1250–1255.
- Ben-Ari, Y. (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 375–403.
- Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2000). Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci.* 23, 580–587.
- Bureau, I., Bischoff, S., Heinemann, S.F., and Mulle, C. (1999). Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J. Neurosci.* 19, 653–663.
- Bureau, I., Dieudonne, S., Coussen, F., and Mulle, C. (2000). Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6838–6843.
- Castillo, P.E., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388, 182–186.
- Cossart, R., Esclapez, M., Hirsch, J.C., Bernard, C., and Ben-Ari, Y. (1998). GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat. Neurosci.* 1, 470–478.
- Cui, C., and Mayer, M.L. (1999). Heteromeric kainate receptors formed by the coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7. *J. Neurosci.* 19, 8281–8291.
- DeVries, S.H. (2000). Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron* 28, 847–856.
- Frerking, M., and Nicoll, R.A. (2000). Synaptic kainate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 342–351.
- Frerking, M., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1998). Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat. Neurosci.* 1, 479–486.
- Garcia, E.P., Mehta, S., Blair, L.A., Wells, D.G., Shang, J., Fukushima,

- T., Fallon, J.R., Garner, C.C., and Marshall, J. (1998). SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron* 21, 727–739.
- Henze, D.A., Card, J.P., Barrionuevo, G., and Ben-Ari, Y. (1997). Large amplitude miniature excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons are of mossy fiber origin. *J. Neurophysiol.* 77, 1075–1086.
- Katona, I., Acsády, L., and Freund, T.F. (1999). Postsynaptic targets of somatostatin-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus. *Neuroscience* 88, 37–55.
- Kidd, F.L., and Isaac, J.T. (1999). Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature* 400, 569–573.
- Lerma, J., Paternain, A.V., Rodríguez-Moreno, A., and López-García, J.C. (2001). Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol. Rev.* 81, 971–998.
- Li, H., and Rogawski, M.A. (1998). GluR5 kainate receptor mediated synaptic transmission in rat basolateral amygdala in vitro. *Neuropharmacology* 37, 1279–1286.
- Li, P., Wilding, T.J., Kim, S.J., Calejesan, A.A., Huettner, J.E., and Zhuo, M. (1999). Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature* 397, 161–164.
- Livsey, C.T., and Vicini, S. (1992). Slower spontaneous excitatory postsynaptic currents in spiny versus aspiny hilar neurons. *Neuron* 8, 745–755.
- Magee, J.C., and Cook, E.P. (2000). Somatic EPSP amplitude is independent of synapse location in hippocampal pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 3, 895–903.
- McAllister, A.K., and Stevens, C.F. (2000). Nonsaturation of AMPA and NMDA receptors at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6173–6178.
- McBain, C.J., and Fisahn, A. (2001). Interneurons unbound. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 11–23.
- Miles, R., and Wong, R.K. (1983). Single neurones can initiate synchronized population discharge in the hippocampus. *Nature* 306, 371–373.
- Mulle, C., Sailer, A., Perez-Otano, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P.E., Bureau, I., Maron, C., Gage, F.H., Mann, J.R., Bettler, B., and Heinemann, S.F. (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392, 601–605.
- Mulle, C., Sailer, A., Swanson, G.T., Brana, C., O’Gorman, S., Bettler, B., and Heinemann, S.F. (2000). Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 28, 475–484.
- Paternain, A.V., Morales, M., and Lerma, J. (1995). Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* 14, 185–189.
- Petralia, R.S., Wang, Y.X., and Wenthold, R.J. (1994). Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* 349, 85–110.
- Qin, L., Marrs, G.S., McKim, R., and Dailey, M.E. (2001). Hippocampal mossy fibers induce assembly and clustering of PSD95-containing postsynaptic densities independent of glutamate receptor activation. *J. Comp. Neurol.* 440, 284–298.
- Represa, A., Tremblay, E., and Ben-Ari, Y. (1987). Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience* 20, 739–748.
- Stoppini, L., Buchs, P.A., and Müller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37, 173–182.
- Swanson, G.T., and Heinemann, S.F. (1998). Heterogeneity of homomeric GluR5 kainate receptor desensitization expressed in HEK293 cells. *J. Physiol. (Lond.)* 513, 639–646.
- Swanson, G.T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., and Cull-Candy, S.G. (1996). Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J. Physiol. (Lond.)* 492, 129–142.
- Traub, R.D., Bibbig, A., Fisahn, A., LeBeau, F.E., Whittington, M.A., and Buhl, E.H. (2000). A model of gamma-frequency network oscillations induced in the rat CA3 region by carbachol in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4093–4106.
- Vignes, M., and Collingridge, G.L. (1997). The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388, 179–182.
- Watt, A.J., van Rossum, M.C., MacLeod, K.M., Nelson, S.B., and Turrigiano, G.G. (2000). Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron* 26, 659–670.
- Wilding, T.J., and Huettner, J.E. (1995). Differential antagonism of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-preferring and kainate-preferring receptors by 2,3-benzodiazepines. *Mol. Pharmacol.* 47, 582–587.

-Article 2-

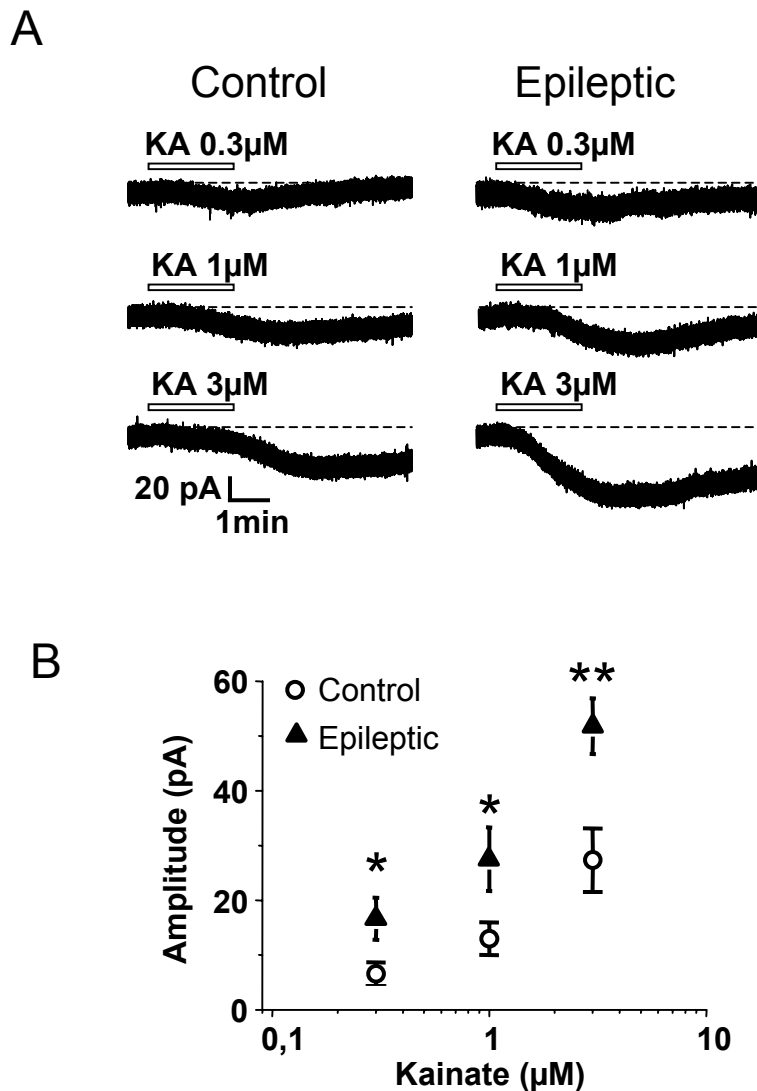
Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats.

Epsztein J, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y and Crépel V.

J Neurosci. 2005 Sep 7;25(36):8229-39.

Les récepteurs KA sont fortement associés aux épilepsies du lobe temporal depuis les premiers travaux montrant qu'une injection de KA induit des crises limbiques associées à un patron de mort neuronale et de bourgeonnement axonal similaire à la sclérose hippocampique observée chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal. Depuis, les effets épileptogéniques de cette substance ont été confirmés par de nombreuses études à la fois *in vitro* et *in vivo* et certains travaux suggèrent que cet effet puisse être dû à l'activation spécifique des récepteurs KA. Cependant, le rôle des récepteurs KA post-synaptiques activés par le glutamate endogène chez des animaux chroniquement épileptiques reste peu connu. Comme nous l'avons vu, les récepteurs KA post-synaptiques sont spécifiquement associés aux synapses moussues dans les cellules pyramidales de la région CA3 de rats contrôles. Chez les animaux chroniquement épileptiques et chez un grand nombre de patients atteints d'épilepsie du lobe temporal les fibres moussues bourgeonnent et viennent former des synapses aberrantes au niveau des cellules granulaires. Dans ce second projet, nous nous sommes demandé si le bourgeonnement moussu était susceptible d'induire la formation de synapses KA fonctionnelles au niveau des cellules granulaires du gyrus denté chez des animaux chroniquement épileptiques.

Pour ce projet nous avons choisi de travailler sur le modèle pilocapine d'épilepsie du lobe temporal. Ces animaux présentent, plusieurs mois après l'injection, des crises spontanées récurrentes d'origine limbique (Turski et al., 1983). A ce stade on parle d'animaux chroniquement épileptiques. Dans une première série d'expériences nous avons voulu comparer les EPSCs évoqués par la stimulation des afférences glutamatergiques dans la couche moléculaire interne au niveau des cellules granulaires de rats contrôles et chroniquement épileptiques. La stimulation de ces afférences chez le rat contrôle, en présence d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> et NMDA, génère un événement ayant une cinétique rapide qui est complètement bloqué en présence d'un antagoniste des récepteurs AMPA, même après stimulation à haute fréquence (30 Hz). Chez le rat chroniquement épileptique, une stimulation identique génère un événement synaptique ayant une cinétique rapide puis lente en présence des mêmes antagonistes. L'application d'un antagoniste des récepteurs AMPA bloque la composante rapide de l'EPSC mais pas la composante lente. Celle-ci est bloquée en présence d'un antagoniste mixte des récepteurs AMPA et KA. Ces premiers résultats montrent que les synapses glutamatergiques formées au niveau de la couche



**Figure 36. Amplitude des courants induits par application de kainate  
Au niveau de cellules granulaires de rats contrôles et épileptiques**

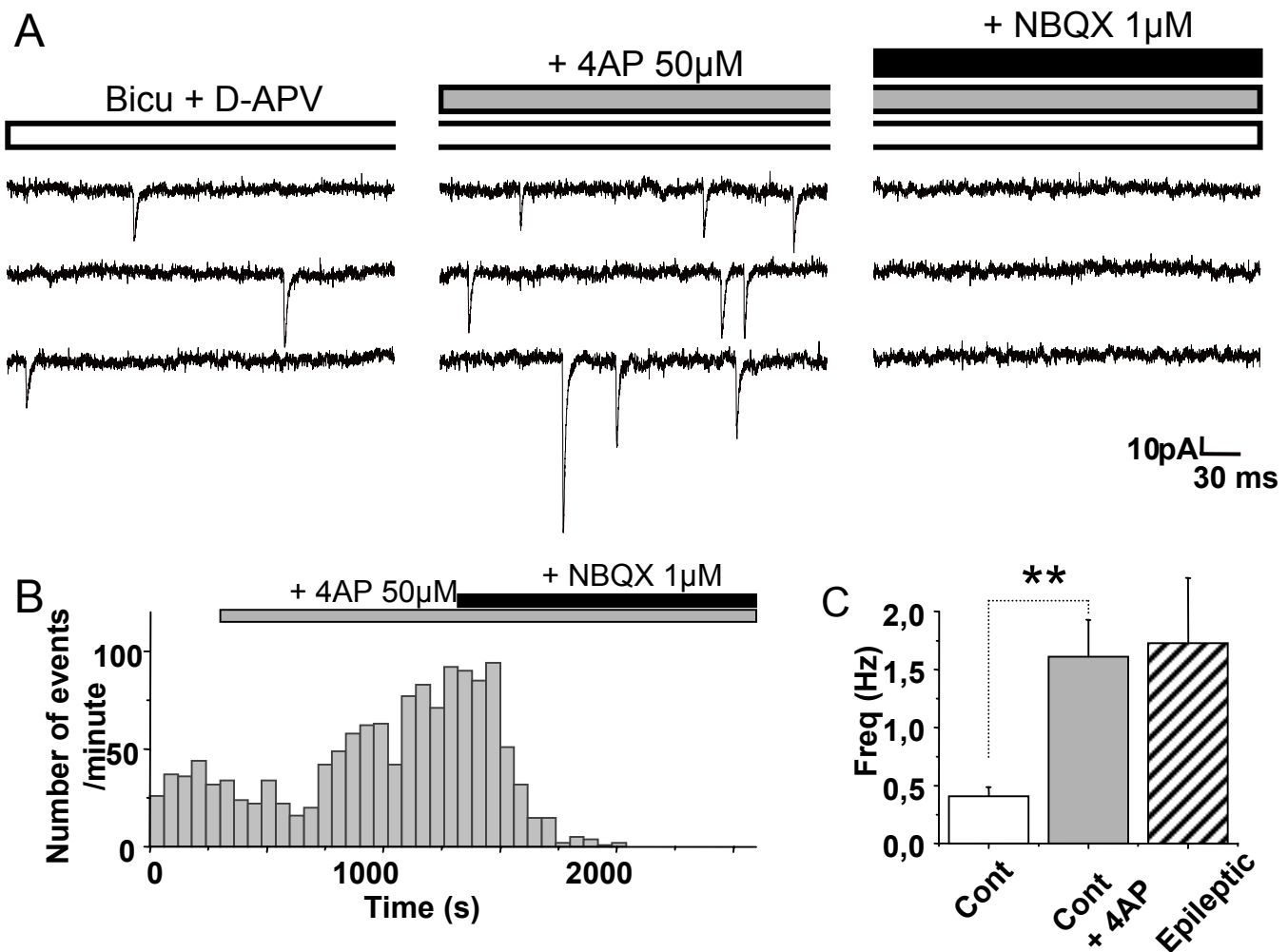
A. Exemples représentatifs de courants induits par des applications de KA aux concentrations indiquées pendant deux minutes dans les cellules granulaires de rats contrôles et épileptiques.  
B. Amplitude maximale des courants induits par des applications de KA exprimées en fonction de la concentration de KA utilisée.



moléculaire interne des rats contrôles par les cellules moussues du hilus, n'activent pas de récepteurs KA post-synaptiques. Au contraire, les synapses formées au niveau de cette même couche moléculaire interne mais vraisemblablement par les fibres moussues récurrentes après dégénérescence des cellules moussues, activent les récepteurs KA.

Si de nouvelles synapses formées au niveau des cellules granulaires de rat épileptiques chroniques activent des récepteurs KA post-synaptiques, le nombre de récepteurs KA adressés à la membrane plasmique devrait être augmenté. Pour tester cette hypothèse nous avons comparé l'amplitude des courants induits par des applications de KA (à des concentrations qui activent spécifiquement les récepteurs KA ; Mulle et al., 1998) dans les cellules granulaires de rats contrôles et épileptiques chroniques (Fig. 36A). Ces courants ont été enregistrés en présence de TTX (1 $\mu$ M), de bicuculline (10 $\mu$ M) et de D-APV (40 $\mu$ M). Dans ces conditions nous avons observé que l'amplitude de ces courants était significativement plus grande dans les cellules granulaires de rat épileptiques chroniques que dans les cellules granulaires de rats contrôles ( $p < 0.05$  pour 0.3 et 1 $\mu$ M,  $p < 0.01$  pour 3 $\mu$ M;  $n = 9$  ; Fig. 36B). Les concentrations de KA utilisées activent spécifiquement les récepteurs KA post-synaptiques car l'amplitude des courants induits par 3 $\mu$ M de KA n'est pas significativement différente en présence et en absence de GYKI 52466 (100 $\mu$ M ;  $46.5 \pm 13.3$  pA et  $40.5 \pm 7.08$  pA en absence et en présence de GYKI 52466, respectivement;  $n = 3$ ,  $p > 0.05$ ). De plus, nous avons constaté que des applications d'un agoniste sélectif des récepteurs KA contenant la sous-unité GluR5 (ATPA 1 $\mu$ M) ne générât aucun courant au niveau des cellules granulaires de rats épileptiques chroniques. Ce résultat suggère que les récepteurs exprimés au niveau de la membrane plasmique de ces cellules ne contiennent pas la sous-unité GluR5.

Nous avons voulu ensuite déterminer si ces récepteurs KA pouvaient être activés par la libération spontanée de glutamate. Nous avons donc enregistré les cellules granulaires du gyrus denté en patch-clamp en configuration cellule entière en voltage imposé à  $-70$ mV (le potentiel d'inversion des courants GABAergiques dans nos conditions expérimentales). A ce potentiel, les récepteurs NMDA sont principalement bloqués par le magnésium (voir chapitre II). Nous avons observé que, suite au bourgeonnement des fibres moussues, la fréquence des événements synaptiques non-NMDA était significativement augmentée dans les cellules granulaires de rats chroniquement épileptiques en comparaison des contrôles (comme décrit précédemment ; Wuarin and Dudek, 2001). Mais, en plus de ces changements quantitatifs, nous avons observé un changement qualitatif dans les caractéristiques cinétiques et pharmacologiques des événements enregistrés. En effet dans les cellules granulaires des rats contrôles, les événements synaptiques excitateurs étaient uniformément rapides et bloqués



**Figure 37. Les cellules granulaires de rats contrôles ne génèrent pas d'EPSCKA même lorsque l'activité est augmentée**

A. Événements spontanés enregistrés dans une cellule granulaire de rat contrôle en présence de bicuculline (10  $\mu$ M) et de D-APV (40 M). Notez l'augmentation de fréquence des événements spontanés induite par la 4-AP. Tous ces événements sont des EPSCAMPA car ils sont bloqués par le NBQX 1  $\mu$ M.

B. Décours temporel de l'effet de la 4-AP et du blocage des événements synaptiques par le NBQX.

C. Moyenne des fréquences des événements spontanés enregistrés avant (Cont.) et après (Cont + 4AP) ajout de 4-AP (50  $\mu$ M) dans le milieu extracellulaire. Notez qu'en présence de 4-AP, la fréquence des événements est significativement augmentée et n'est pas significativement différente de celle observée dans les cellules granulaires d'animaux chroniquement épileptiques (Epileptic).

par des antagonistes des récepteurs AMPA tandis que dans les cellules granulaires des rats chroniquement épileptiques, des événements ayant des cinétiques plus lentes étaient enregistrés en plus des événements rapides observés en contrôle. Ces événements lents, contrairement aux événements rapides, étaient toujours observés en présence d'antagonistes des récepteurs AMPA mais étaient supprimés par l'ajout d'un antagoniste mixte des récepteurs AMPA/KA. Nous avons vérifié qu'aucun événement lent GYKI-résistant n'était observé dans les cellules granulaires de rats contrôles même dans des conditions où l'activité synaptique est accrue (lorsque les cellules sont dépolarisées par un antagoniste des récepteurs potassiques responsables du courant  $I_D$ ; Fig. 37). Nous pouvions alors conclure que les récepteurs KA post-synaptiques participent à la transmission synaptique dans les cellules granulaires de rats épileptiques chroniques mais pas contrôles.

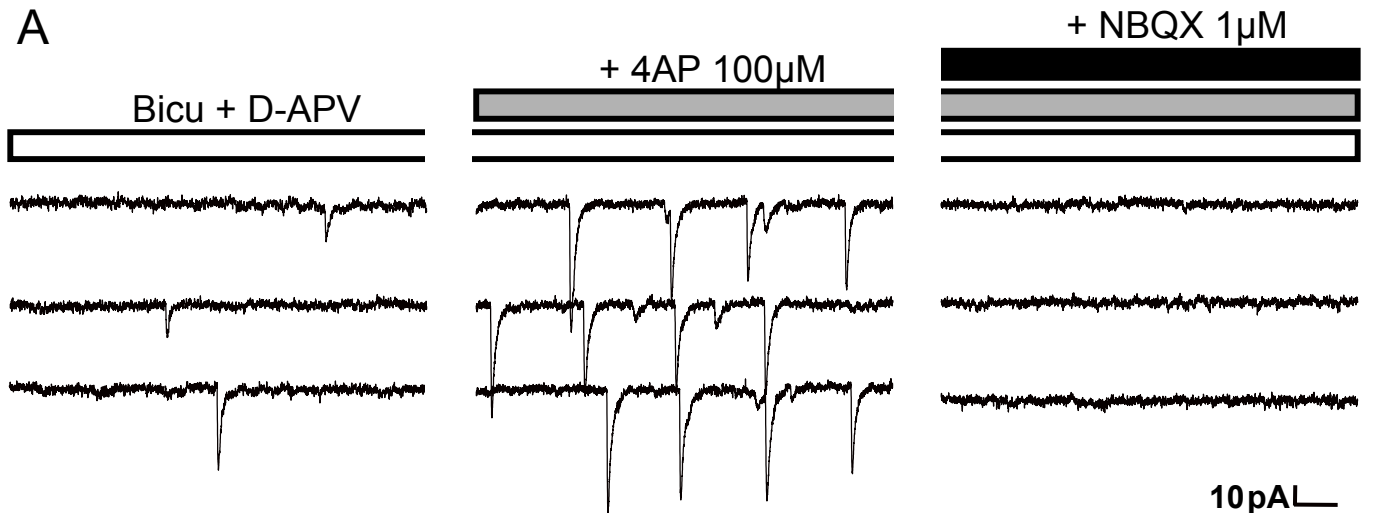
Nous avons ensuite voulu savoir si la contribution des récepteurs KA à la transmission synaptique intervenait avant ou après le bourgeonnement des fibres moussues et le début des crises spontanées. Pour répondre à cette question nous avons enregistré des rats 4 à 5 jours après l'injection de pilocarpine et le *status epilepticus* initial. Ces animaux ne présentent pas de bourgeonnement des fibres moussues ni de crises spontanées. L'enregistrement des cellules granulaires de ces animaux montre que tous les événements synaptiques non-NMDA sont bloqués par un antagoniste des récepteurs AMPA même lorsque l'excitabilité du réseau est artificiellement augmentée par ajout de 4-AP (voir Fig. 38).

Nous avons ensuite déterminé les caractéristiques cinétiques des EPSC<sub>AMPA</sub> et EPSC<sub>KA</sub> pharmacologiquement isolés de façon à pouvoir les identifier en l'absence d'antagonistes des récepteurs AMPA et déterminer ainsi la contribution des récepteurs KA à la transmission synaptique glutamatergique non-NMDA dans les cellules granulaires de rats chroniquement épileptiques. Les analyses cinétiques ont été effectuées sur les événements miniatures en présence de SYM 2081 (1 $\mu$ M) pour isoler les mEPSC<sub>AMPA</sub> et de GYKI 52466 (100 $\mu$ M) ou NBQX (1 $\mu$ M) pour isoler les mEPSC<sub>KA</sub>. Ces analyses montrent que les mEPSC<sub>KA</sub> représentent 50% des mEPSCs enregistrés dans les cellules granulaires de rats épileptiques chroniques et 45% des EPSCs spontanés. Donc la contribution de EPSC<sub>KA</sub> à la transmission synaptique glutamatergique dans ces cellules est très significative.

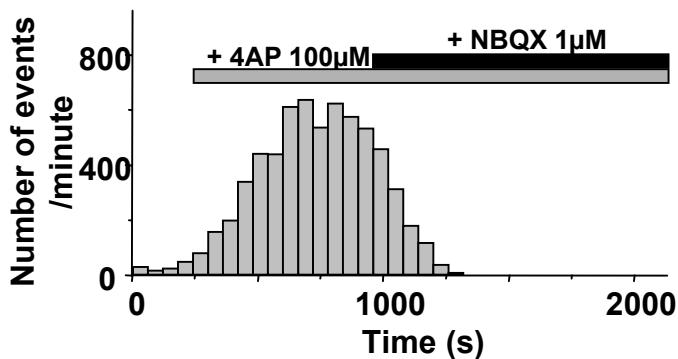
Nous avons voulu ensuite déterminer si les EPSC<sub>KA</sub> étaient générés par les fibres moussues comme le suggéraient les expériences de stimulation dans la couche moléculaire interne. Dans ces expériences, un protocole de stimulation minimal fut utilisé pour limiter les risques de contamination de l'EPSC évoqué par la stimulation d'autres fibres. Ces stimulations

## Post-status Rat

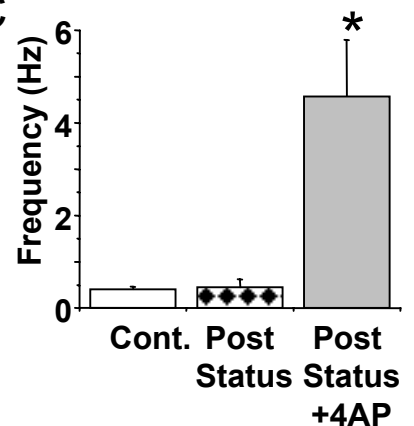
A



B



C



**Figure 38. Les cellules granulaires de rats post-status ne génèrent pas d' EPSC<sub>Ka</sub> même lorsque l'activité est augmentée**

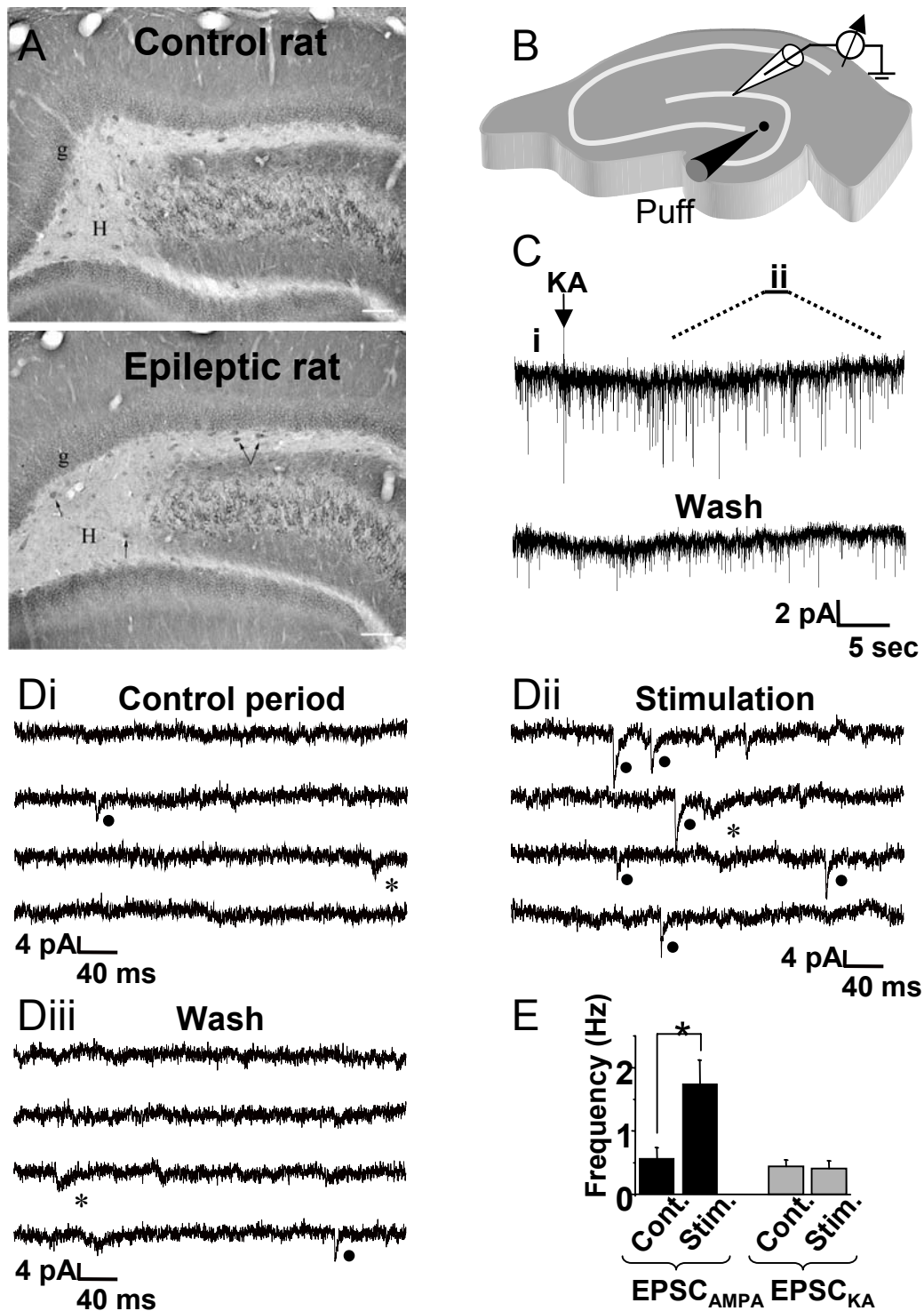
A. Événements spontanés enregistrés dans une cellule granulaire de rat post-status en présence de bicuculline (10μM) et de D-APV (40 M). Notez l'augmentation de fréquence des événements spontanés induite par la 4-AP. Tous ces événements sont des EPSC<sub>Ka</sub> car ils sont bloqués par le NBQX 1μM.

B. Décours temporel de l'effet de la 4-AP et du blocage des événements synaptiques par le NBQX.

C. Moyenne des fréquences des événements spontanés enregistrés avant (Post-status) et après (Post Status+4AP) ajout de 4-AP (50μM) dans le milieu extracellulaire. Notez qu'en présence de 4-AP, la fréquence des événements est significativement augmentée.

furent générées dans la couche moléculaire interne en présence de fortes concentrations de cations divalents (voir chapitre II et Jonas et al., 1993). Ces stimulations évoquèrent soit un événement ayant une cinétique lente correspondant à celle des mEPSC<sub>KA</sub> enregistrés dans les mêmes cellules soit un échec de la transmission synaptique. Ces événements unitaires étaient bien dus à l'activation de récepteurs KA post-synaptiques (uEPSC<sub>KA</sub>) car ils étaient observés en présence d'antagoniste des récepteurs AMPA (NBQX 1 $\mu$ M) et bloqués en présence de CNQX (50 $\mu$ M). Pour déterminer si ces événements étaient bien dus à l'activation des fibres moussues et non à l'activation des afférences en provenance de cellules moussues qui auraient résisté au status épilepticus (Scharfman et al., 2001), nous avons utilisé deux propriétés spécifiques des fibres moussues : i) le fait que les fibres moussues expriment des récepteurs métabotropiques du groupe II (mGluR 2/3) au niveau pré-synaptique (contrairement aux afférences des cellules moussues) dont l'activation provoque une diminution de la transmission synaptique moussues et une augmentation du nombre d'échecs de la transmission synaptique lors de stimulations minimales (Feng et al., 2003) ; ii) le fait qu'une faible augmentation de la fréquence de stimulation diminue le nombre d'échecs de la transmission synaptique lors de stimulations minimales (*frequency facilitation*) ; iii) le fait que la transmission synaptique au niveau des fibres moussues soit sélectivement augmentée après augmentation de la concentration pré-synaptique en AMPc. Nous avons observé que la probabilité d'échec de la transmission synaptique des uEPSC<sub>KA</sub> augmentait après application d'un agoniste des mGluR2/3, le DCGIV (1 $\mu$ M) et qu'elle diminuait lorsque la fréquence de stimulation passait de 0.2Hz à 1Hz. De plus, nous avons observé que l'augmentation de la concentration en AMPc par un activateur de l'adénylate cyclase augmentait la fréquence des mEPSC<sub>KA</sub> et des mEPSC<sub>AMPA</sub>. L'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure que les fibres moussues récurrentes génèrent des EPSC<sub>KA</sub> dans les cellules granulaires de rats épileptiques chroniques. Le fait qu'un activateur de l'adénylate cyclase augmente la fréquence des EPSC<sub>AMPA</sub> suggère que les fibres moussues récurrentes génèrent également des EPSC<sub>AMPA</sub> dans les cellules granulaires de rats épileptiques chroniques.

Nous avons ensuite voulu déterminer si, chez le rat épileptique chronique, les cellules granulaires pouvaient générer des EPSC<sub>KA</sub> et des EPSC<sub>AMPA</sub> dans des cellules granulaires distantes via le réseau des fibres moussues récurrentes. Nous avons donc procédé à la stimulation locale d'un ensemble de cellules granulaires en utilisant des applications locales de KA tout en enregistrant une cellule granulaire distante. De telles stimulations évoquent dans les tranches obtenues à partir d'animaux chroniquement épileptiques (mais pas d'animaux contrôles) une augmentation de la fréquence des EPSC dans la cellule granulaire



**Figure 39. La stimulation focale dans le hilus entraîne une augmentation de la fréquence des EPSC<sub>AMPA</sub> mais pas des EPSC<sub>KA</sub> dans les cellules granulaires de rats chroniquement épileptiques**

A. Immunohistochimie avec des anticorps anti GluR2/3 montrant la survie d'un certain nombre de cellules moussues du hilus chez les rats épileptiques chroniques.

B. Dispositif expérimental.

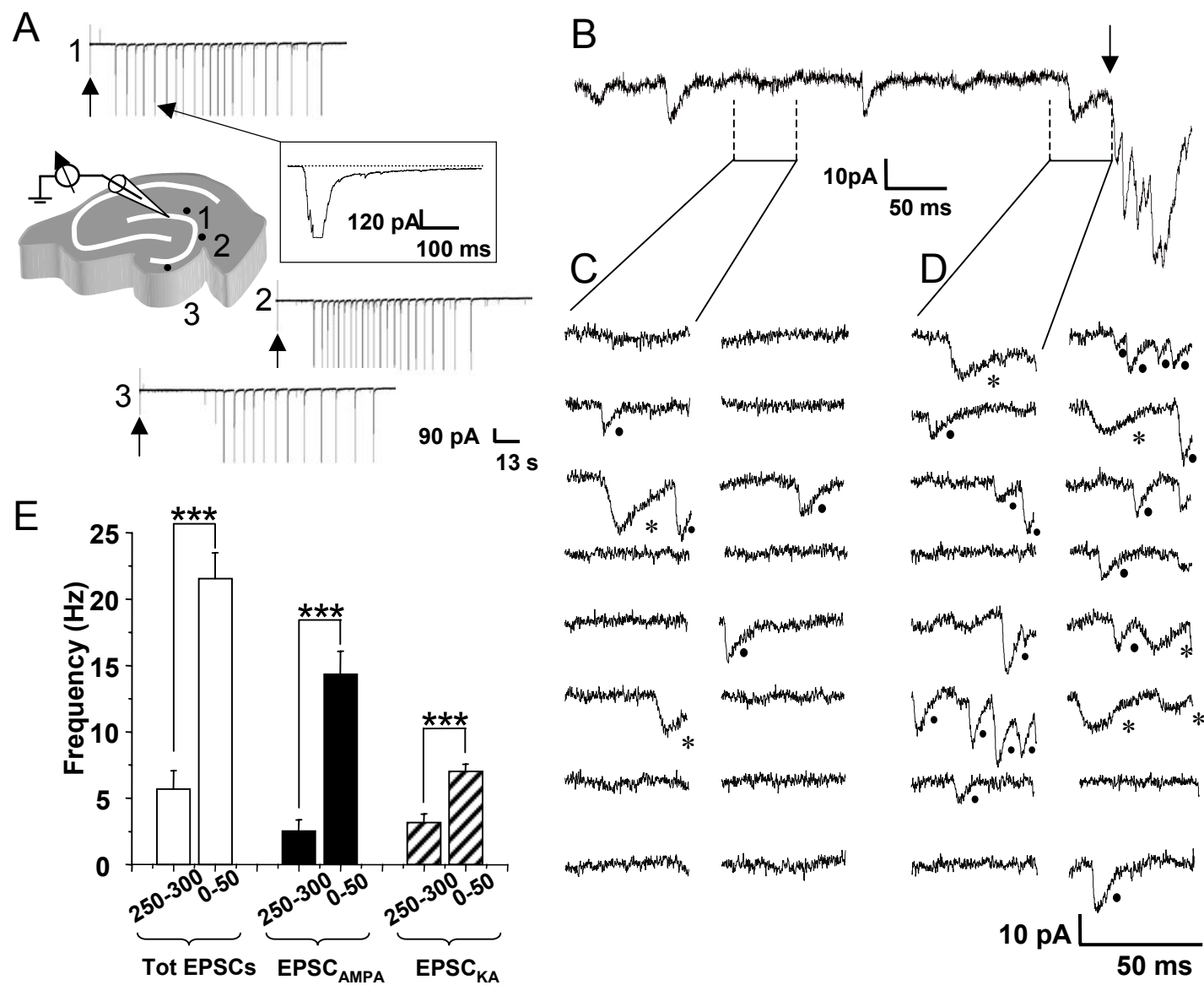
C. Augmentation de fréquence des EPSCs suite à la stimulation focale.

D,E. Seule la fréquence des EPSC<sub>AMPA</sub> est significativement augmentée.

distante enregistrée. L'avantage de cette méthode est de permettre la stimulation d'un nombre important de cellules granulaires (car la connectivité 1-1 est faible au niveau du réseau récurrent des cellules granulaires Scharfman et al., 2003) et de produire une augmentation de fréquence pendant une durée suffisamment longue pour nous permettre d'identifier les EPSC<sub>AMPA</sub> et les EPSC<sub>KA</sub> grâce à nos critères cinétiques. Ces expériences nous ont permis de montrer que la fréquence des EPSC<sub>AMPA</sub> et des EPSC<sub>KA</sub> était augmentée après stimulation. Donc les fibres moussues récurrentes activent des récepteurs post-synaptiques AMPA et KA au niveau des cellules granulaires chez le rat épileptique chronique.

Certains travaux récents ont rapporté la survie d'un certain nombre de cellules moussues dans le modèle pilocarpine d'épilepsie du lobe temporal (Scharfman et al., 2001). Nous avons voulu savoir si des cellules moussues avaient survécu au *status epilepticus* dans nos conditions expérimentales. Des expériences d'immunohistochimie utilisant des anticorps des récepteurs GluR2/3 (spécifiquement exprimés par les cellules moussues du hilus (Leranth et al., 1996) montrent qu'en accord avec les résultats précédents, 1/3 des cellules moussues survivent dans nos conditions expérimentales (Fig. 39A). Pour déterminer si ces cellules génèrent des EPSC<sub>KA</sub> au niveau des cellules granulaires nous avons reproduit les expériences de stimulation focale mais en plaçant l'électrode de stimulation dans le hilus (Fig. 39B). Dans ces conditions, nous avons également pu observer une augmentation de la fréquence des EPSCs enregistrés dans les cellules granulaires mais seule la fréquence des EPSC<sub>AMPA</sub> était augmentée (Fig. 39C-E). Le même résultat a été obtenu en utilisant un protocole de stimulation identique chez le rat contrôle. Cette expérience nous a permis de conclure que des cellules moussues survivaient au *status epilepticus* dans nos conditions expérimentales mais qu'elles ne génèrent pas d'EPSC<sub>KA</sub> au niveau des cellules granulaires de rats épileptiques chroniques.

Si les EPSC<sub>KA</sub> représentent une part importante des EPSCs spontanés enregistrés dans les cellules granulaires de rats épileptiques, ces événements devraient participer à la genèse des activités de type interictales supportées par le réseau des fibres moussues récurrentes dans des conditions accrues d'excitabilité. Pour tester cette hypothèse nous avons induit des activités récurrentes dans le réseau des fibres moussues par activation antidromique d'un petit nombre de cellules granulaires et nous avons comparé la sévérité de ces activités en l'absence et en présence de SYM 2081 utilisé comme un antagoniste fonctionnel des récepteurs KA. Nos résultats montrent que ces activités pouvaient être générées en présence de SYM 2081 mais que leur sévérité était significativement diminuée.



**Figure 40. Augmentation de la fréquence des EPSC<sub>AMPA</sub> et des EPSC<sub>KA</sub> avant les décharges épileptiformes évoquées dans le gyrus denté de rats épileptiques chroniques**

A. Dispositif expérimental montrant la position d'une cellule enregistrée sur une tranche d'hippocampe et trois endroits (1, 2 et 3) où des applications focales de KA (30mM) ont permis d'induire des activités synchrones épileptiformes (en insert, stimulation à la flèche).

B. Événements spontanés enregistrés en présence de bicuculline (10μM) et D-APV (40μM) avant un événement synchrone (début à la flèche).

C, D. Exemples de traces 250-300 ms et 0-50 ms avant les événements synchrones enregistrés dans la même cellule qu'en B. Notez que dans l'intervalle 0-50 ms la fréquence des EPSC<sub>AMPA</sub> (points noirs) et des EPSC<sub>KA</sub> (étoiles) est augmentée.

E. Graphique représentant la moyenne des fréquences de tous les EPSCs (Tot EPSCs) des EPSC<sub>AMPA</sub> et des EPSC<sub>KA</sub> avant les bursts pour les intervalles 250-300 ms et 0-50 ms. Notez que la fréquence des EPSC<sub>AMPA</sub> et des EPSC<sub>KA</sub> est significativement augmentée dans l'intervalle 0-50ms (\*\*\*: p<0.001).



La synchronisation de l'activité au sein des réseaux récurrents est un phénomène dépendant de la fréquence. Une augmentation de la fréquence des EPSCs est souvent observée avant chaque activité synchrone (Chamberlin et al., 1990). Ces EPSCs, par leur sommation, participeraient à la synchronisation de l'activité au sein du réseau. Si les EPSC<sub>KA</sub> participent à la synchronisation du réseau, leur fréquence devrait être augmentée juste avant l'apparition d'une activité synchrone (Chamberlin et al., 1990). Pour tester cette hypothèse, nous avons généré des activités synchrones dans le réseau récurrent des fibres moussues par stimulation focale d'un ensemble de cellules granulaires (par application de KA 30mM) dans des conditions d'excitabilité accrue du réseau (bicuculline 10 $\mu$ M et 0.3 Mg<sup>2+</sup>). Le D-APV a également été ajouté pour pouvoir différencier les EPSC<sub>AMPA</sub> et les EPSC<sub>KA</sub> sur la base de nos critères cinétiques. Dans ces conditions, chaque stimulation était susceptible d'évoquer plusieurs activités synchrones (en moyenne  $28.8 \pm 4.44$  /stimulation; Fig. 40). Nous avons comparé la fréquence des EPSC<sub>AMPA</sub> et des EPSC<sub>KA</sub> 250-300 ms avant chaque activité synchrone (à un moment où la sommation des EPSCs ne peut influencer la survenue de l'activité synchrone) et 0-50 ms avant (50 ms étant la durée maximum des EPSCs enregistrés dans nos conditions donc permettant une sommation temporelle). Nous avons observé que la fréquence globale des EPSCs était augmentée de  $5.71 \pm 1.38$  Hz pour l'intervalle 250-300 ms à  $21.5 \pm 1.94$  Hz pour l'intervalle 0-50 ms avant les activités synchrones (n=317 activités synchrones évoquées par 11 stimulations, n=3, p<0.001; Fig. 40C-D et 40E; Chamberlin et al., 1990). Cette augmentation correspondait à la fois à une augmentation de la fréquence des EPSC<sub>KA</sub> (de  $3.17 \pm 0.65$  Hz dans l'intervalle 250-300 ms à  $7.03 \text{ Hz} \pm 0.53$  Hz dans l'intervalle 0-50 ms avant les activités synchrones; p<0.001; Fig. 40C-D et 40E) et des EPSC<sub>AMPA</sub> (de  $2.55 \pm 0.83$  Hz dans l'intervalle 250-300 ms à  $14.4 \pm 1.72$  Hz dans l'intervalle 0-50 ms, p<0.001; Figures 40C-E).

Cette observation suggère que les EPSC<sub>AMPA</sub> et les EPSC<sub>KA</sub> participent à la synchronisation du réseau récurrent des fibres moussues.

# Recurrent Mossy Fibers Establish Aberrant Kainate Receptor-Operated Synapses on Granule Cells from Epileptic Rats

Jérôme Epsztein, Alfonso Represa, Isabel Jorquera, Yehezkel Ben-Ari, and Valérie Crépel

Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 29, and Université de la Méditerranée, Parc Scientifique de Luminy, 13273 Marseille Cedex 09, France

Glutamatergic mossy fibers of the hippocampus sprout in temporal lobe epilepsy and establish aberrant synapses on granule cells from which they originate. There is currently no evidence for the activation of kainate receptors (KARs) at recurrent mossy fiber synapses in epileptic animals, despite their important role at control mossy fiber synapses. We report that KARs are involved in ongoing glutamatergic transmission in granule cells from chronic epileptic but not control animals. KARs provide a substantial component of glutamatergic activity, because they support half of the non-NMDA receptor-mediated excitatory drive in these cells. KAR-mediated EPSC<sub>KAs</sub> are selectively generated by recurrent mossy fiber inputs and have a slower kinetics than EPSC<sub>AMPA</sub>. Therefore, in addition to axonal rewiring, sprouting of mossy fibers induces a shift in the nature of glutamatergic transmission in granule cells that may contribute to the physiopathology of the dentate gyrus in epileptic animals.

**Key words:** kainate receptors; mossy fibers; granule cells; hippocampus; epilepsy; kainic acid

## Introduction

In both human patients and animal models of temporal lobe epilepsy (TLE), glutamatergic fibers sprout and establish novel synapses that lead to an enhanced glutamatergic excitatory drive, which may contribute to seizure generation (Ben-Ari and Represa, 1990; Nadler, 2003). Glutamate acts on three main types of ionotropic receptors: AMPA receptors (AMPA), NMDA receptors (NMDARs), and kainate receptors (KARs) receptors. Classically, the activation of AMPA receptors is responsible for most of the glutamatergic excitatory drive on central neurons. However, recent studies indicate that KAR-operated synapses play a more important role than initially thought in glutamatergic transmission (Castillo et al., 1997; Vignes and Collingridge, 1997; Cossart et al., 1998; Frerking et al., 1998; Li and Rogawski, 1998; DeVries and Schwartz, 1999; Li et al., 1999). Despite this important role, it is not known whether glutamatergic fibers establish KAR-operated synapses after sprouting to aberrant targets in chronic epileptic rats. Sprouting of mossy fibers is one of the best-documented examples of seizure-triggered reactive plasticity in human patients and animal models of TLE (Represa et al., 1989, 1993; Sutula et al., 1989; Isokawa et al., 1993; Mello et al., 1993; Franck et al., 1995; Okazaki et al., 1995; Buckmaster and Dudek, 1999). This sprouting leads to the formation of a func-

tional recurrent excitatory circuit between granule cells (GCs) (Tauck and Nadler, 1985; Wuarin and Dudek, 1996; Molnar and Nadler, 1999; Lynch and Sutula, 2000; Buckmaster et al., 2002; Scharfman et al., 2003), which accounts for, in part, the enhanced ability of the hippocampus to generate epileptiform activities in hippocampal slices from animal models and from patients with TLE (Patrylo and Dudek, 1998; Hardison et al., 2000; Gabriel et al., 2004).

In the control hippocampus, several observations have shown that KAR-mediated synaptic transmission is strongly associated to the presence of mossy fiber terminals: (1) the stratum lucidum (the target zone of mossy fibers on CA3 pyramidal neurons) contains among the highest density of KARs in the brain (Monaghan and Cotman, 1982); (2) the stimulation of mossy fibers selectively generate EPSC<sub>KA</sub> in CA3 pyramidal cells (Castillo et al., 1997; Vignes and Collingridge, 1997; Mulle et al., 1998; Cossart et al., 2002); (3) lesions of the mossy fibers both reduce the density of KARs (Represa et al., 1987) and suppress KAR-mediated synaptic transmission in CA3 pyramidal cells (Cossart et al., 2002); (4) the apparition of EPSC<sub>KA</sub> in CA3 pyramidal cells is correlated with the postnatal development of mossy fiber synapses (Marchal and Mulle, 2004). Furthermore, the binding profile of radioactive kainate is correlated to mossy fiber sprouting in animal models of TLE and in patients with epilepsy (Represa et al., 1987, 1989). Therefore, we asked whether the formation of aberrant mossy fiber synapses onto granule cells would trigger the expression of functional KAR-operated synapses in chronic epileptic rats.

We report that EPSC<sub>KAs</sub> are involved in evoked, spontaneous, and miniature glutamatergic synaptic transmission in dentate GCs from epileptic but not control rats. EPSC<sub>KAs</sub> provide a substantial component of glutamatergic transmission in GCs from

Received April 14, 2005; revised July 14, 2005; accepted July 19, 2005.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. We thank Dr. R. Cossart for helpful comments and Dr. M. Esclapez for help with the pilocarpine-treated rats. J.E. is a fellow of the French "Ministère de la Recherche" and was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale.

Correspondence should be addressed to Valérie Crépel, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Parc Scientifique de Luminy, Boîte Postale 13, 13273 Marseille Cedex 9, France. E-mail: crepel@inmed.univ-mrs.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1469-05.2005

Copyright © 2005 Society for Neuroscience 0270-6474/05/258229-11\$15.00/0

epileptic rats, because they represent half of the glutamatergic excitatory drive. The EPSC<sub>KAs</sub> that display a slow kinetics when compared with EPSC<sub>AMPA</sub> are generated by recurrent mossy fiber synapses. Accordingly, blockade of KARs significantly reduces mossy fiber network-driven activities.

## Materials and Methods

All experiments were approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Animal Care and Use Committee.

**Pilocarpine treatment.** Adult male Wistar rats (200–450 g; Janvier Breeding Center, Le Genest-Saint-Isle, France) were injected intraperitoneally with pilocarpine hydrochloride (325–340 mg/kg) 30 min after a low dose of cholinergic antagonist scopolamine methyl nitrate (1 mg/kg, i.p.). Approximately 60% of the rats experienced class IV/V seizures (Racine, 1972). After 3 h of status epilepticus, diazepam (8 mg/kg) was injected intraperitoneally. After a seizure-free period of several weeks, the rats experienced spontaneous seizures. Only rats that experienced many spontaneous seizures, which were expected to display a high degree of mossy fiber sprouting (Tauck and Nadler, 1985), were selected for recordings (2–8 months after the pilocarpine injection; mean,  $4.55 \pm 0.44$  months; chronic epileptic rats,  $n = 36$ ). Some rats were also used 4–5 d after the status epilepticus (poststatus epilepticus rats,  $n = 2$ ). Age-matched rats ( $n = 20$ ) were used as controls.

**Slice preparation.** Animals were deeply anesthetized with chloral hydrate (350 mg/kg, i.p.) and decapitated. The brain was removed rapidly, the hippocampi were dissected, and transverse 400- $\mu$ m-thick hippocampal slices were cut using a Leica VT1000S tissue slicer (Leica, Nussloch, Germany). Slices were then transferred for rest (>1 h) in oxygenated normal artificial CSF (ACSF) containing the following (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 2.0 CaCl<sub>2</sub>, and 10 D-glucose, pH 7.4.

**Patch-clamp recordings.** Whole-cell recordings of granule cells were obtained using the “blind” patch-clamp technique in a submerged chamber (ASCF; 30–32°C) in voltage-clamp mode. Tight-seal electrodes (5–8 M $\Omega$ ) were filled with an internal solution containing the following (in mM): 135 gluconic acid, 135 CsOH, 10 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 HEPES, 2 MgATP, 0.4 NaGTP, and 0.5% biocytin, pH 7.25. Whole-cell recordings were performed using an Axopatch 200A amplifier (Molecular Devices, Union City, CA). Data were filtered at 2 kHz, digitized (20 kHz) with a Labmaster interface card (Molecular Devices) to a personal computer, and acquired using Axoscope 7.0 software (Molecular Devices). Signals were analyzed off-line using MiniAnalysis 6.0.1 (Synaptosoft, Decatur, GA). Access resistance ranged between 10 and 20 M $\Omega$ , and the results were discarded if the access resistance changed by >20%. The input membrane resistance ( $R_m$ ) and the membrane capacitance ( $C_m$ ) were not significantly different in the dentate GCs from control ( $C_m = 18.4 \pm 2.54$  pF;  $R_m = 194 \pm 17.9$  M $\Omega$ ;  $n = 14$ ) and epileptic rats ( $C_m = 17.7 \pm 2.29$  pF;  $R_m = 181 \pm 26.9$  M $\Omega$ ;  $n = 12$ ; Mann–Whitney  $U$  test;  $p = 0.777$  for  $C_m$  and  $p = 0.341$  for  $R_m$ ).

**Electrical stimulations.** Bulk and minimal stimulations were performed via a bipolar NiCh electrode or a monopolar glass electrode (~1 M $\Omega$ ; filled with ACSF), positioned in the inner one-third of the molecular layer of the dentate gyrus. For minimal stimulations, the stimulus intensity and pulse duration were progressively enhanced to the lowest values that evoked all or no EPSCs (typically between 20 and 30  $\mu$ s and 30 and 50 V; 0.2 Hz). Minimal EPSCs were accepted if their amplitude exceeded twice the baseline noise and if they occurred at a constant latency <5 ms. The mossy fiber pathway was stimulated antidromically (40–60  $\mu$ s; 40–60 V; 0.2 Hz) using a bipolar NiCh electrode in the stratum lucidum CA3b as described previously (Okazaki and Nadler, 2001). Evoked responses were recorded in the granule cell layer with extracellular glass recording electrodes (2–3 M $\Omega$ ; filled with normal ACSF) using a DAM-80 amplifier (low filter, 1 Hz; high filter, 3 KHz; World Precision Instruments, Sarasota, FL).

**Glutamate agonist application.** Focal applications of kainate (30  $\mu$ M in ACSF) were performed via a glass pipette connected to a Picospritzer (General Valve, Fairfield, NJ).

**Kinetic analysis.** The kinetics of synaptic events was analyzed using

MiniAnalysis 6.0.1 as reported previously (Cossart et al., 2002) in a double-blind manner. To quantify the contribution of AMPARs and KARs to synaptic transmission in dentate GCs of epileptic rats, we statistically determined limits for decay times of miniature events to segregate between EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>KAs</sub> with a 95% confidence interval. For this purpose, we used the Gaussian curve fitting of the histogram plots of decay times of all mEPSCs. The experiments performed in the presence of AMPAR antagonists [100  $\mu$ M 1-(4-aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine (GYKI 52466) or 1  $\mu$ M 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfonyl-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX)] or a KAR blocker [10  $\mu$ M (2S,4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081)] enabled us to determine the statistical limit to classify miniature events as EPSC<sub>KAs</sub> (see Fig. 3C, right) (decay time, >5.9 ms;  $p < 0.05$ ) or EPSC<sub>AMPA</sub> (see Fig. 4C, right) (decay time, <5.5 ms;  $p < 0.05$ ), respectively. Using these kinetic limits, selected EPSC<sub>KAs</sub> and EPSC<sub>AMPA</sub>s fall beyond a 5% confidence interval for pharmacologically isolated EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>KAs</sub>, respectively. Furthermore, <5% of the total non-NMDAR-mediated miniature events could not be classified as EPSC<sub>AMPA</sub> or EPSC<sub>KAs</sub> in our experimental conditions. The charge transfer through the AMPAR- and KAR-mediated EPSC was calculated as described previously (Cossart et al., 2002).

**Statistical analysis.** All values are given as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using SigmaStat 3.1 (Systat Software, Richmond, CA). For comparison between two groups, the unpaired Student's  $t$  test was used if the data passed the normality test and the equal variance test; otherwise, the Mann–Whitney rank-sum test was used. For comparison of one group before and after a pharmacological or physiological treatment, the paired Student's  $t$  test was used if the data passed the normality test; otherwise, the Wilcoxon signed rank test was used. To compare two Gaussian distributions, the Kolmogorov–Smirnov test was performed. To compare two cumulative probability plots, the  $\chi^2$  test was performed. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .  $n$  refers to the number of cells except when indicated otherwise.

**Morphological analysis.** Timm staining was performed routinely on sections used for electrophysiological recordings (Tauck and Nadler, 1985; Wuarin and Dudek, 2001). In brief, sections were incubated for 15 min in an Na<sub>2</sub>S solution and fixed with 4% paraformaldehyde. Slices were resectioned in a cryostat (40  $\mu$ m thick) and processed with the Timm solution (Represa et al., 1987). For immunofluorescence analysis, rats were deeply anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde in PBS. Hippocampal sections (40  $\mu$ m thick) were obtained with a vibratome and incubated with either rabbit anti-glutamate receptor 2/3 (GluR2/3; 1:100; Chemicon, Temecula, CA) or vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1; 1:1000; Synaptic Systems, Goettingen, Germany) followed by goat anti-rabbit cyanine 3-conjugated (1:200; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). In all cases, no labeling was detected when specific antibodies were replaced with normal rabbit or mouse serum. Semiquantitative analyses of the intensity of immunolabeling were performed on optical sections obtained with an Olympus fluoview-500 laser-scanning microscope (Olympus Optical, Tokyo, Japan) using a 20 $\times$  lens. For each control and pilocarpine animal, fluorescence intensity was measured in the granule cell layer and molecular layer of the dentate gyrus (eight different hippocampal sections from five different animals). The corpus callosum was used as a reference value for background. All images were acquired with the same scanning conditions. Statistical analyses were performed using ANOVA and Student's  $t$  tests. The identity of recorded cells was assured by the revelation of the biocytin injected through the patch pipette accordingly to the protocol used previously (Cossart et al., 2002). Only well defined granule cells were considered in the present study.

**Chemicals.** Drugs were purchased from Sigma (St. Louis, MO) (TTX, 4-AP, biocytin, pilocarpine hydrochloride, and scopolamine methyl nitrate), Tocris Neuramin (Bristol, UK) [GYKI 52466, SYM 2081, bicuculline, NBQX, CNQX, D-APV, 2-(2,3-dicarboxycyclopropyl)-glycine (DCGIV), forskolin (FSK), and kainate], and Roche (Basel, Switzerland) (diazepam).

## Results

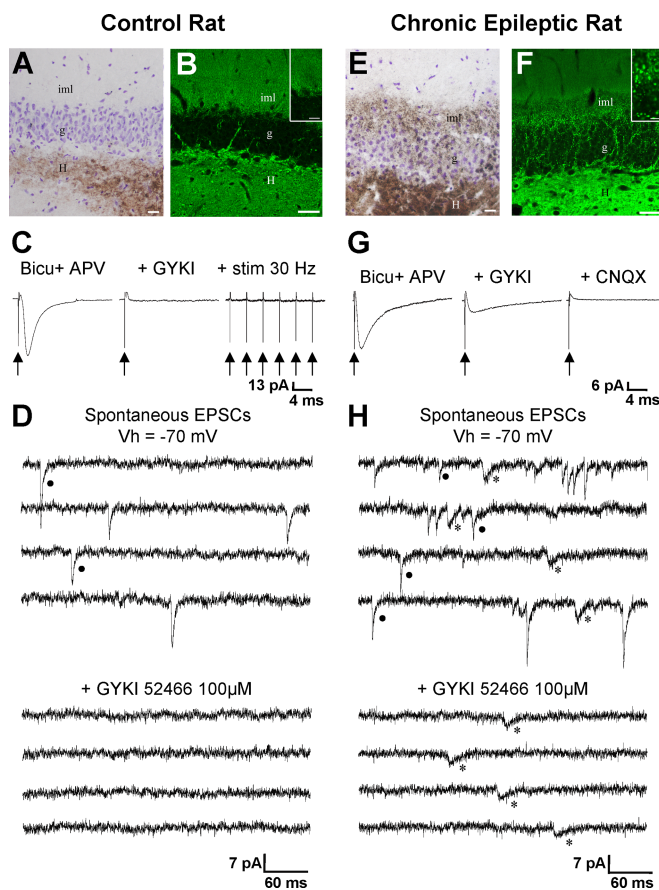
### Sprouting of mossy fibers in chronic epileptic rats

As in previous studies (Sutula et al., 1988; Mello et al., 1993; Represa et al., 1993; Okazaki et al., 1995; Buckmaster et al., 2002), an extensive sprouting of mossy fibers was observed in the dentate gyrus of chronic epileptic rats months after the pilocarpine injection and the inaugurating status epilepticus. Using Timm staining to reveal mossy fiber boutons, both the granule cell layer and the inner one-third of the molecular layer of the dentate gyrus were labeled in chronic epileptic rats (Fig. 1*E*), whereas only the hilar polymorph layer was labeled in controls (Fig. 1*A*). Because mossy fibers are glutamatergic (Henze et al., 2000), antibodies to VGLUT1, which specifically stain glutamatergic terminals (Freneau et al., 2004), were also used to assess mossy fiber sprouting (Fig. 1*B,F*). Instead of the uniform staining with fine spots observed in control slices (Fig. 1*B*, inset), larger and brighter spots (Fig. 1*F*, inset) were observed in regions corresponding to recurrent mossy fiber terminal zones (i.e., the dentate granular and inner molecular layers) but not in other regions in which sprouting did not take place. According to this, we found a significant increase in VGLUT1 immunoreactivity in the inner molecular layer and the granular layer (by  $152.4 \pm 15.4\%$ ; unpaired *t* test; *p* = 0.001) but not in other regions (i.e., the outer molecular layer *p* = 0.76). The bigger spots displayed similar features than those observed in the CA3 stratum lucidum (data not shown) and may correspond to the newly formed mossy fiber synapses that are of larger size than other glutamatergic synapses and are highly enriched in clear, round synaptic vesicles (Represa et al., 1993). Therefore, the dentate gyrus from chronic epileptic rats displays sprouting of glutamatergic mossy fibers in our experimental conditions.

### Kainate receptor-mediated synaptic events in granule cells from chronic epileptic but not control rats

In control GCs, low-frequency stimulations (0.033 Hz) in the inner one-third of the molecular layer evoked a synaptic current with a rapid decay in the continuous presence of antagonists of GABA<sub>A</sub> (10  $\mu$ M bicuculline) and NMDA (40  $\mu$ M D-APV) receptors (Fig. 1*C*, left). This current was mediated by AMPA receptors, because it was completely blocked by the AMPAR antagonist GYKI 52466 (Fig. 1*C*, middle) (100  $\mu$ M; *n* = 5), even when repetitive stimulations were applied (Fig. 1*C*, right) (10 stimuli at 30 Hz). In dentate GCs from chronic epileptic rats (*n* = 5), low-frequency stimulations (0.033 Hz) of recurrent mossy fibers in the inner one-third of the molecular layer evoked a synaptic current with a fall composed of both a rapid and a slow component (Fig. 1*G*, left) (*n* = 5). Application of GYKI 52466 (100  $\mu$ M) blocked the rapid component but not the slow component (Fig. 1*G*, middle). The slow component was mediated by KARs, because it was subsequently blocked by the mixed AMPAR/KAR antagonist CNQX (Fig. 1*G*, right) (50  $\mu$ M). Therefore, stimulation in the inner one-third of the dentate molecular layer evoked KAR-mediated synaptic responses in dentate granule cells from epileptic rats but not control rats.

We next tested whether KARs can be activated by the spontaneous release of glutamate (Cossart et al., 2002) in dentate GCs from epileptic rats. Dentate GCs were recorded at the reversal potential for GABAergic currents ( $V_h$  = -70 mV), a potential at which NMDAR-mediated currents are also abolished by Mg<sup>2+</sup> block (Ascher and Nowak, 1988). In dentate GCs from epileptic rats, the frequency of spontaneous EPSCs was significantly higher than that in control rats (compare Fig. 1*D,H*) ( $1.65 \pm 0.54$  Hz, *n* = 18 and  $0.41 \pm 0.06$  Hz, *n* = 17, respectively; Mann–Whitney;



**Figure 1.** Mossy fiber sprouting and EPSCs in granule cells from epileptic rats. *A, E*, Timm staining (dark brown; counterstained with cresyl violet) of mossy fibers of control (*A*) and epileptic (*E*) rat sections after electrophysiological recordings. In chronic epileptic rats, mossy fiber collaterals invade the granule cell layer (g) and the inner third of the molecular layer (iml). Scale bars, 20  $\mu$ m. *B, F*, VGLUT1 immunostaining of sections from control (*B*) and epileptic (*F*) rats. In epileptic rats, the staining dramatically increases in the inner molecular layer (iml) and granule cell layer, in good correlation with the sprouting of mossy fibers. In the inner molecular layer, the type of staining is modified, as large spots (characteristic of the staining of large mossy fiber synaptic boutons) have replaced the fine speckled staining observed in the control (enlarged in the insets). Scale bars, 50  $\mu$ m; insets, 10  $\mu$ m. *C, G*, Averages of 30 individual EPSCs recorded in the presence of 10  $\mu$ M bicuculline (Bicu) and 40  $\mu$ M D-APV (APV). In control granule cells (*C*), the EPSC evoked in control conditions (left) was completely blocked by AMPA receptor antagonist GYKI 52466 (GYKI; 100  $\mu$ M; middle), even when repetitive stimulations were applied (10 stimuli at 30 Hz; stim 30 Hz; right). In dentate granule cells from epileptic rats (*G*), the EPSC evoked in control conditions displayed a rapid and a slow decay (left). Application of GYKI 52466 (GYKI; 100  $\mu$ M) blocked the rapid but not the slow component (middle); the slow component was subsequently abolished by the mixed AMPAR/KAR antagonist CNQX (50  $\mu$ M; right). *D, H*, Representative sEPSC recordings ( $V_h$  = -70 mV in this and subsequent figures) from a control granule cell (*D*) and a granule cell from pilocarpine-treated rat (*H*), showing that the non-NMDAR-mediated synaptic transmission is enhanced in epileptic tissue. Note that in control tissue, all of the synaptic events are fast (filled circle; *D*) and mediated by AMPARs, because they are fully abolished by 100  $\mu$ M GYKI 52466 (*D*). In contrast, in the epileptic tissue, the non-NMDAR-mediated synaptic transmission additionally includes slow events (asterisk; *H*) that are resistant to 100  $\mu$ M GYKI 52466 (*H*).

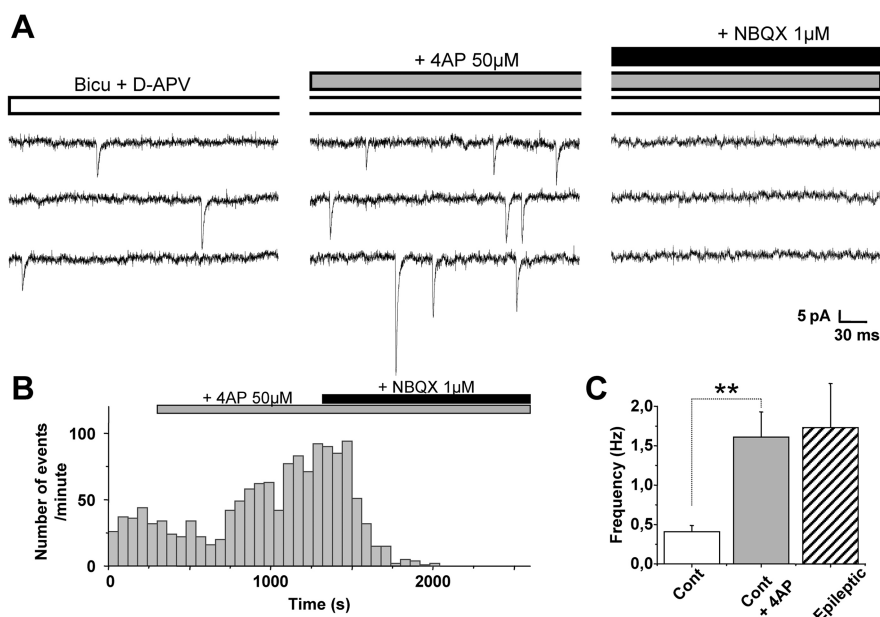
*p* = 0.021) as reported previously (Wuarin and Dudek, 2001). Visual inspection of EPSCs revealed the presence of events with fast and slow kinetics in GCs from epileptic rats, whereas only fast events were observed in control cells (compare Fig. 1*D,H*). The fast events recorded in control GCs were mediated by AMPARs, because they were all blocked by GYKI 52466 (Fig. 1*D*) (100  $\mu$ M; *n* = 5). The slow EPSCs recorded in GCs from epileptic rats were mediated by KARs, because they were resistant to GYKI 52466



(Fig. 1H) ( $100 \mu\text{M}$ ;  $n = 5$ ) and fully abolished by the mixed AMPAR/KAR antagonist CNQX ( $50 \mu\text{M}$ ;  $n = 5$ ; data not shown). In control GCs, the nonobservation of slow EPSC<sub>KA</sub> could result from the low frequency of spontaneous synaptic activity in these cells. To address this, we artificially increased the spontaneous synaptic activity in control cells using 4-AP ( $50\text{--}100 \mu\text{M}$ ), a potassium channel antagonist, in the continuous presence of bicuculline ( $10 \mu\text{M}$ ) and D-APV ( $40 \mu\text{M}$ ). In the presence of 4-AP, the frequency of spontaneous EPSCs recorded in control GCs was drastically increased (Fig. 2A–C) (from  $0.41 \pm 0.08$  to  $1.61 \pm 0.32$  Hz;  $n = 5$ ; Mann–Whitney;  $p = 0.008$ ) and was not significantly different from that observed in GCs from epileptic rats (Fig. 2C) ( $n = 18$ ; Mann–Whitney;  $p = 0.146$ ). In these conditions, all non-NMDAR-mediated EPSCs were fully abolished by AMPAR antagonists NBQX (Fig. 2A,B) ( $1 \mu\text{M}$ ;  $n = 3$ ) (Bureau et al., 1999; Cossart et al., 2002) or GYKI 52466 ( $100 \mu\text{M}$ ;  $n = 2$ ). Thus, KARs contribute to the spontaneous and evoked synaptic transmission in granule cells from chronic epileptic rats but not control rats.

To determine whether the contribution of KARs to spontaneous synaptic transmission in GCs occurred before or after the onset of chronic epilepsy, we recorded spontaneous non-NMDAR-mediated EPSCs in 4- to 5-d-poststatus epilepticus rats that did not express behavioral seizures and showed no evidence of mossy fiber sprouting using Timm staining (data not shown). The frequency of spontaneous EPSCs recorded in GCs from 4- to 5-d-poststatus epilepticus rats was not significantly different from that recorded in control GCs ( $0.45 \pm 0.17$  Hz,  $n = 5$  and  $0.41 \pm 0.06$  Hz,  $n = 17$ , respectively; Mann–Whitney;  $p = 1.00$ ) (supplemental Fig. S1A,C, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material), as reported previously (Wuarin and Dudek, 2001). Visual inspection of EPSCs revealed the presence of events with fast kinetics only that were all blocked by the AMPAR antagonist GYKI 52466 ( $100 \mu\text{M}$ ;  $n = 5$ ; data not shown). As in control GCs, the nonobservation of slow EPSC<sub>KA</sub> in GCs from 4- to 5-d-poststatus epilepticus rats could result from the low frequency of spontaneous synaptic activity in these cells. Therefore, we increased the spontaneous synaptic activity in GCs from 4- to 5-d-poststatus epilepticus rats using 4-AP ( $100 \mu\text{M}$ ) in the continuous presence of bicuculline ( $10 \mu\text{M}$ ) and D-APV ( $40 \mu\text{M}$ ). In the presence of 4-AP, the frequency of spontaneous EPSCs was drastically increased (from  $0.45 \pm 0.17$  to  $4.57 \pm 1.22$  Hz;  $n = 5$ ; paired  $t$  test;  $p = 0.028$ ) (supplemental Fig. S1A,C, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). In these conditions, all non-NMDAR-mediated EPSCs were fully abolished by AMPAR antagonists NBQX ( $1 \mu\text{M}$ ;  $n = 3$ ) (supplemental Fig. S1A,B, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material) or GYKI 52466 ( $100 \mu\text{M}$ ;  $n = 2$ ). In conclusion, KARs contribute to synaptic transmission in granule cells from chronic epileptic rats but not control rats or 4- to 5-d-poststatus epilepticus rats.

## Control Rat

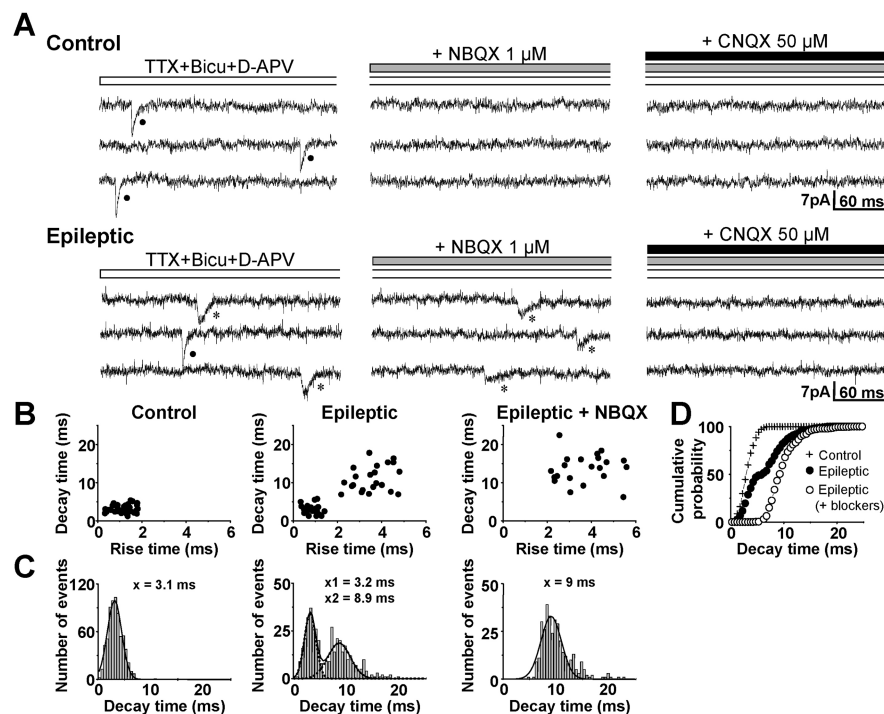


**Figure 2.** Control granule cells do not generate EPSC<sub>KA</sub>, even in conditions of increased spontaneous activity. **A**, Spontaneous EPSC recordings in the presence of bicuculline (Bicu;  $10 \mu\text{M}$ ) and D-APV ( $40 \mu\text{M}$ ) in a control granule cell. Note that application of 4-AP ( $50 \mu\text{M}$ ) strongly increases the frequency of EPSCs, which are all mediated by AMPARs, because they are fully abolished by  $1 \mu\text{M}$  NBQX. **B**, Histogram plot of the number of spontaneous EPSCs versus time before and during bath application of  $50 \mu\text{M}$  4-AP in a representative control granule cell. The frequency of spontaneous EPSCs is strongly increased during 4-AP application. Subsequent application of  $1 \mu\text{M}$  NBQX fully abolished all of the spontaneous EPSCs. **C**, Bar graphs of the mean frequency of spontaneous EPSCs recorded in control granule cells (in the presence of bicuculline and D-APV;  $n = 5$ ) in the absence (Cont) and in the presence of 4-AP ( $50 \mu\text{M}$ ). Note that in the presence of 4-AP, the mean frequency of spontaneous EPSCs is significantly increased (\*\* $p < 0.01$ ) and similar to that of spontaneous EPSCs recorded in granule cells from pilocarpine-treated rats ( $n = 18$ ;  $p > 0.05$ ).

## Kinetics of mEPSC<sub>AMPA</sub> and mEPSC<sub>KA</sub> in granule cells from epileptic rats

We next characterized the kinetics of pharmacologically isolated mEPSC<sub>AMPA</sub> and mEPSC<sub>KA</sub> to subsequently determine their contribution to synaptic activity in the absence of any antagonist (Cossart et al., 2002). Miniature EPSCs (mEPSCs) were recorded in the presence of TTX ( $1 \mu\text{M}$ ), bicuculline ( $10 \mu\text{M}$ ), and D-APV ( $40 \mu\text{M}$ ) to isolate non-NMDAR-mediated glutamatergic events. There was no significant difference between the frequencies of miniature glutamatergic events recorded in dentate GCs from control rats and those from chronic epileptic rats ( $0.25 \pm 0.09$  Hz for controls,  $n = 14$  and  $0.27 \pm 0.06$  Hz for epileptic rats,  $n = 12$ ; Mann–Whitney;  $p = 0.487$ ). However, we observed a significant shift toward slower values when comparing the cumulative probability plots of decay times of all mEPSCs recorded in GCs from epileptic and control rats (Fig. 3D) ( $\chi^2$  test;  $p < 0.001$ ). In GCs from control rats ( $n = 14$ ), all miniature events displayed a fast kinetics (Fig. 3A) and clustered in one area of the graph in scatter plots of 10–90% rise times versus decay times (Fig. 3B). The histogram of the decay times of miniature events revealed that fast events belonged to one population, because their distribution was best fitted by one Gaussian curve (Fig. 3C, left). All of these events were mediated by AMPARs, because they were fully blocked by NBQX (Fig. 3A) ( $1 \mu\text{M}$ ;  $n = 9$ ) or GYKI 52466 ( $100 \mu\text{M}$ ;  $n = 5$ ; mEPSC<sub>AMPA</sub>;  $r = 1.29 \pm 0.07$  ms;  $\tau = 3.26 \pm 0.18$  ms;  $n = 14$ ).

In GCs from epileptic rats ( $n = 12$ ), we observed slow, miniature events (mEPSC<sub>slow</sub>) in addition to the fast events (mEPSC<sub>fast</sub>) (Fig. 3A). mEPSCs clustered within two separated



**Figure 3.** mEPSC<sub>KA</sub> can be pharmacologically isolated in the presence of AMPA receptor antagonists in granule cells from epileptic rats. **A**, mEPSC recordings in the presence of 1  $\mu$ M TTX, 10  $\mu$ M bicuculline (Bicu), and 40  $\mu$ M D-APV in a granule cell from control and epileptic rats. In the control cell, mEPSCs have only fast kinetics. In the cell from an epileptic rat, fast (filled circles) and slow (asterisk) events can be recorded. Fast events are mediated by AMPARs, because they are blocked by 1  $\mu$ M NBQX. Slow mEPSCs are mediated by KARs, because they are NBQX resistant and abolished by 50  $\mu$ M CNQX. **B**, Scatter plots of mEPSC 10–90% rise times versus decay times in a granule cell from a control and epileptic rat. Note that in the granule cell from an epileptic rat, events cluster in two separate areas of the graph, in contrast to the control cell. In the presence of 1  $\mu$ M NBQX, only events with a slow time course are present in the granule cell from an epileptic rat. **C**, Distribution of decay times of all mEPSCs in granule cells from control (left) and epileptic (middle) rats. In granule cells from epileptic rats, the distribution is fitted with two Gaussian curves (dotted lines; mean, 3.2 and 8.9 ms, respectively) in contrast to control neurons (mean, 3.1 ms). In granule cells from epileptic rats, only mEPSCs with a slow decay time (346 events recorded in 11 cells; right) are resistant to AMPAR antagonists (1  $\mu$ M NBQX or 100  $\mu$ M GYKI 52466); the distribution is now fitted by one Gaussian curve (mean, 9 ms). **D**, Cumulative probability plot of the decay time constant of all mEPSCs in granule cells from control (cross) and epileptic (filled circle) rats. In granule cells from epileptic rats, the decay time distribution is significantly shifted toward slower values ( $\chi^2$  test;  $p < 0.001$ ). The addition of AMPAR antagonists (1  $\mu$ M NBQX or 100  $\mu$ M GYKI 52466) further shifted the curve toward slower values (open circle;  $\chi^2$  test;  $p < 0.01$ ) in accordance with the blockade of fast EPSC<sub>AMPA</sub>.

areas of the graph in scatter plots of 10–90% rise times versus decay times (Fig. 3B). The histogram of the decays of miniature events revealed that mEPSC<sub>fast</sub> and mEPSC<sub>slow</sub> belonged to two distinct populations, because it was best fitted by two statistically different Gaussian curves (Fig. 3C, middle) (Kolmogorov–Smirnov;  $p < 0.005$ ). Bath applications of AMPAR antagonists (1  $\mu$ M NBQX,  $n = 6$ ; or 100  $\mu$ M GYKI 52466,  $n = 5$ ) selectively suppressed the fast events (Fig. 3A) as shown by the histogram of the decay times (compare Fig. 3C, middle and right) and the cumulative probability plot of the decay times (Fig. 3D) as well as the plot of 10–90% rise times versus decay times (Fig. 3B). The miniature events that remained in the presence of AMPAR antagonists were mediated by KARs, because they were fully abolished by the mixed AMPAR/KAR antagonist CNQX (Fig. 3A) (50  $\mu$ M; mEPSC<sub>KA</sub>,  $r = 2.53 \pm 0.28$ ;  $\tau = 9.83 \pm 0.82$ ;  $n = 11$ ). mEPSC<sub>KA</sub> and mEPSC<sub>slow</sub> (recorded in the absence of the AMPAR antagonist) represented the same population of events, because the Gaussian curve fitting the mEPSC<sub>KA</sub> distribution and the one fitting mEPSC<sub>slow</sub> were not significantly different (compare Fig. 3C, right and middle) (Kolmogorov–Smirnov;  $p > 0.1$ ). In keeping with this, the group of events obtained when plotting 10–90% rise times versus decay times of mEPSC<sub>KA</sub> overlapped that of

mEPSC<sub>slow</sub> but not that of mEPSC<sub>fast</sub> (Fig. 3B). To pharmacologically isolate mEPSC<sub>AMPA</sub> in GCs from epileptic rats, we used bath application of SYM 2081 ( $n = 5$ ), a compound that selectively desensitizes KARs (DeVries and Schwartz, 1999; Li et al., 1999). SYM 2081 (10  $\mu$ M) blocked the slow events (Fig. 4A) as shown by the histogram (Fig. 4C) and the cumulative probability plot of the decay times of miniature events (Fig. 4D) as well as the plot of 10–90% rise times versus decay times (Fig. 4B). In the presence of SYM 2081, the remaining fast miniature events were mediated by AMPARs, because they were fully abolished by GYKI 52466 (Fig. 4A) (100  $\mu$ M; mEPSC<sub>AMPA</sub>;  $r = 1.20 \pm 0.28$ ;  $\tau = 3.15 \pm 0.31$ ;  $n = 5$ ). mEPSC<sub>AMPA</sub> and mEPSC<sub>fast</sub> (recorded in the absence of the KAR antagonist) represented the same population of events, because the Gaussian curve fitting the mEPSC<sub>AMPA</sub> distribution and the one fitting mEPSC<sub>fast</sub> were not significantly different (compare Fig. 4C, left and right) (Kolmogorov–Smirnov;  $p > 0.1$ ). In keeping with this, the group of events obtained when plotting 10–90% rise times versus decay times of mEPSC<sub>AMPA</sub> overlapped that of mEPSC<sub>fast</sub> but not that of mEPSC<sub>slow</sub> (Fig. 4B). Furthermore, the kinetics of mEPSC<sub>AMPA</sub> recorded in control GCs and those pharmacologically isolated in GCs from epileptic rats were not significantly different because of the following: (1) the Gaussian curve fitting the distribution of mEPSC<sub>AMPA</sub> in the presence of SYM 2081 in GCs of epileptic rats and the one fitting mEPSC<sub>AMPA</sub> in control GCs were not significantly different (compare Figs. 3C, left, 4C, right) (Kolmogorov–Smirnov;  $p >$

0.1); (2) in cumulative probability plots, the distribution of mEPSCs recorded in GCs from epileptic rats in the presence of SYM 2081 was not significantly different from that recorded in control GCs (Fig. 4D) ( $\chi^2$  test;  $p > 0.1$ ); and (3) they had similar rise and decay time mean values (unpaired  $t$  test;  $p = 0.776$  for 10–90% rise time and  $p = 0.667$  for decay time) (supplemental table, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

We conclude that in GCs from epileptic rats but not control rats, the quantal release of glutamate generates slow mEPSC<sub>KA</sub> in addition to fast mEPSC<sub>AMPA</sub>.

#### Kainate receptors provide half of the spontaneous and miniature glutamatergic currents in granule cells from epileptic rats

To quantify the contribution of AMPARs and KARs to synaptic transmission in dentate GCs from epileptic rats, we statistically determined limits for decay times to segregate EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>KA</sub> in the absence of AMPAR or KAR antagonists (see Materials and Methods). The mean rise and decay time values of EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>KA</sub> selected using these decay time limits were not significantly different from those of pharmacologically isolated events ( $n = 12$ ; paired  $t$  test; mEPSC<sub>AMPA</sub>,  $p = 0.150$  for

10–90% rise time and  $p = 0.646$  for decay time; mEPSC<sub>KA</sub>,  $p = 0.428$  for 10–90% rise time and  $p = 0.610$  for decay time) (supplemental table, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

Using the kinetic limits, we found that the frequencies were  $0.15 \pm 0.05$  and  $0.12 \pm 0.02$  Hz for mEPSC<sub>KA</sub> and mEPSC<sub>AMPA</sub>, respectively ( $n = 12$ ). Thus, mEPSC<sub>KA</sub> represented half of the miniature non-NMDA glutamatergic synaptic events ( $50.8 \pm 6.63\%$ ;  $n = 12$ ). We extended this analysis by calculating the mean charge carried by KARs and AMPARs in digitally averaged mEPSC<sub>KA</sub> and mEPSC<sub>AMPA</sub>. We observed that, as reported previously in other cell types (Frerking and Nicoll, 2000; Cossart et al., 2002), the mean charge transferred during EPSC<sub>KA</sub> was significantly higher than that during EPSC<sub>AMPA</sub> ( $n = 12$ ; Mann–Whitney;  $p = 0.014$ ). Considering the frequency of synaptic events and the charge transferred, we estimated that KARs provided as much as half of the total current mediated by non-NMDARs in dentate GCs from pilocarpine-treated rats ( $56.2 \pm 5.98\%$ ;  $n = 12$ ). We next determined the contribution of KARs to the spontaneous activity. The same limits for decay times were used to segregate between spontaneous EPSC<sub>KA</sub> and EPSC<sub>AMPA</sub>. We found that a significant part of non-NMDAR-mediated spontaneous events recorded in GCs from pilocarpine-treated rats was mediated by KARs ( $45.48 \pm 6.81\%$ ;  $n = 18$ ). Considering the frequency and the charge transferred, we estimated that half ( $52.0 \pm 6.73\%$ ;  $n = 18$ ) of the non-NMDAR-mediated spontaneous glutamatergic drive on dentate GCs was mediated by KARs in pilocarpine-treated rats.

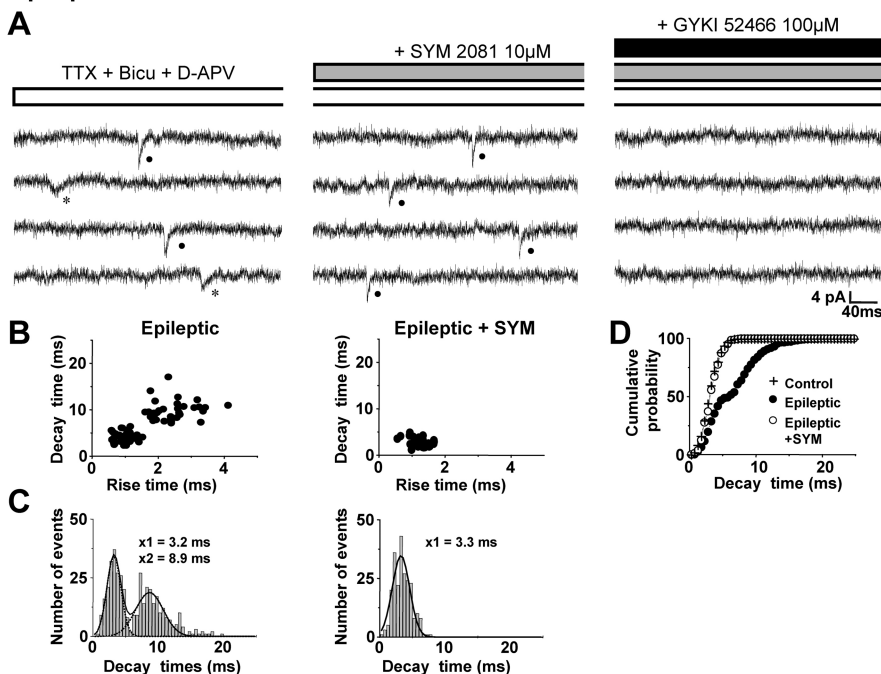
Therefore, KARs are major contributors to miniature and spontaneous synaptic transmission in granule cells from chronic epileptic rats. We then determined whether EPSC<sub>KA</sub>s were generated by recurrent mossy fibers in these cells.

#### Single EPSC<sub>KA</sub> evoked by minimal stimulation shows pharmacological and physiological features of recurrent mossy fiber synapses in granule cells from epileptic rats

Minimal stimulations were performed in the inner one-third of the molecular layer to stimulate single recurrent mossy fibers in the presence of a high-divalent cation concentration (8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), 10  $\mu\text{M}$  bicuculline, and 40  $\mu\text{M}$  D-APV. All-or-none EPSCs (Fig. 5A) with slow kinetics similar to mEPSC<sub>KA</sub> could be evoked in GCs from epileptic rats (supplemental table, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). These EPSCs were mediated by KARs, because they were resistant to applications of NBQX (1  $\mu\text{M}$ ) but fully blocked by CNQX (Fig. 5A,B) (50  $\mu\text{M}$ ;  $n = 5$ ). Fast EPSC<sub>AMPA</sub> (fully blocked by 1  $\mu\text{M}$  NBQX) could also be evoked ( $n = 2$ ; data not shown).

To ensure that minimally evoked EPSC<sub>KA</sub>s were specifically generated by mossy fibers, we relied on the well established sensitivity of mossy fiber EPSCs to the metabotropic GluR2/3

#### Epileptic Rat



**Figure 4.** mEPSC<sub>AMPA</sub> can be pharmacologically isolated in the presence of a kainate receptor blocker in granule cells from epileptic rats. **A**, mEPSC recordings in the presence of 1  $\mu\text{M}$  TTX, 10  $\mu\text{M}$  bicuculline (Bicu), and 40  $\mu\text{M}$  D-APV from a granule cell from epileptic rats. Slow events (asterisk) are mediated by KARs, because they are blocked by 10  $\mu\text{M}$  SYM 2081. Fast events (filled circle) are mediated by AMPARs, because they are SYM 2081 resistant and abolished by 100  $\mu\text{M}$  GYKI 52466. **B**, Scatter plots of mEPSC, 10–90% rise times versus decay times in a granule cell from an epileptic rat. Note that in the presence of 10  $\mu\text{M}$  SYM 2081, only events with a fast time course are present (right). **C**, Distribution of decay time constant of all mEPSCs in granule cells from epileptic rats in the absence (left) and in the presence of 10  $\mu\text{M}$  SYM 2081 (right). Note that in the presence of 10  $\mu\text{M}$  SYM 2081, the distribution of the decay time constant of miniature EPSCs is fitted by one Gaussian curve (mean, 3.3 ms). **D**, Cumulative probability plot of the decay time constant of all mEPSCs recorded in granule cells from control (cross) and epileptic (filled circle) rats. Note that in the presence of 10  $\mu\text{M}$  SYM 2081, the cumulative probability plot is shifted toward faster values (233 events recorded in 5 neurons; open circle;  $\chi^2$  test;  $p < 0.001$ ) and is superimposed to that of control cells ( $\chi^2$  test;  $p > 0.05$ ).

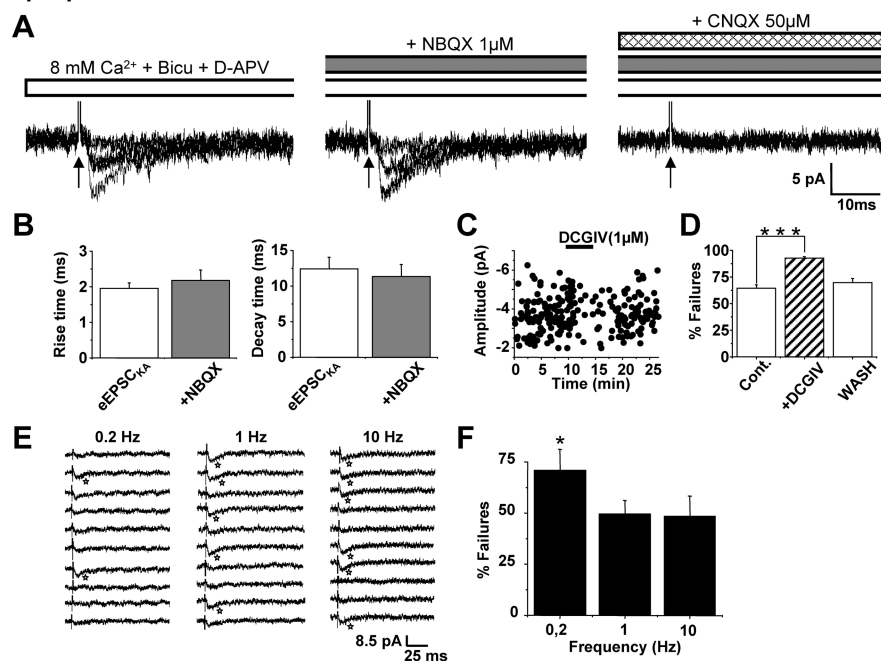
(mGluR2/3) agonist DCGIV (Kamiya et al., 1996). In pilocarpine-treated animals, this agent also reduced synaptic transmission at recurrent mossy fiber synapses (Feng et al., 2003). Applications of DCGIV (1  $\mu\text{M}$ ) enhanced significantly the failure rate of the minimal eEPSC<sub>KA</sub> (Fig. 5C,D) (from  $64.5 \pm 3.12\%$  in control to  $92.6 \pm 1.39\%$  in the presence of DCGIV; washout,  $69.7 \pm 3.89\%$ ;  $n = 6$ ; paired  $t$  test;  $p < 0.001$ ). In contrast, the amplitude of the eEPSC<sub>KA</sub> was not changed (Fig. 5C) (control,  $4.04 \pm 0.54$  pA; DCGIV,  $3.71 \pm 0.19$  pA;  $n = 6$ ; paired  $t$  test;  $p = 0.549$ ). We also relied on the selective form of frequency facilitation expressed both by control and recurrent mossy fiber EPSCs (Salin et al., 1996; Feng et al., 2003). We found that increasing the frequency of stimulation from 0.2 to 1 Hz reduced the failure rate of the minimal eEPSC<sub>KA</sub> from  $78.8 \pm 7.96\%$  at 0.2 Hz to  $51.2 \pm 7.68\%$  at 1 Hz (Fig. 5E,F) ( $n = 5$ ; paired  $t$  test;  $p = 0.037$ ). Enhancing further the frequency of stimulation from 1 to 10 Hz did not decrease further the failure rate (Fig. 5E,F) (failure rate at 10 Hz,  $51.9 \pm 11.2\%$ ; paired  $t$  test;  $p = 0.928$ ). Therefore, EPSC<sub>KA</sub> evoked in the granule cells from epileptic rats displayed specific pharmacological and physiological features of mossy fiber synapses.

#### Recurrent mossy fibers generate both EPSC<sub>KA</sub> and EPSC<sub>AMPA</sub> in granule cells from epileptic rats

To further identify mEPSCs generated by recurrent mossy fibers in GCs from epileptic rats, we tested the effect of FSK, an adenylyl cyclase activator, which has been shown to selectively enhance



## Epileptic Rat



**Figure 5.** Single EPSC<sub>KA</sub> are evoked by minimal stimulation of mossy fibers in granule cells from epileptic rats. **A**, Left, Representative superimposed recordings of minimally evoked unitary EPSCs (eEPSCs;  $n = 6$ ) in granule cells from epileptic rats. Minimal stimulations (arrow) were performed in 8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 10  $\mu\text{M}$  bicuculline (Bicu), and 40  $\mu\text{M}$  D-APV. Unitary events evoked in these conditions are mediated by KARs (eEPSC<sub>KA</sub>), because they are resistant to 1  $\mu\text{M}$  NBQX (middle) and are fully abolished by 50  $\mu\text{M}$  CNQX (right). **B**, Bar graphs of averaged values of rise times (left) and decay times (right) show that the time course of unitary slow events and NBQX (1  $\mu\text{M}$ )-resistant events recorded in dentate granule cells of epileptic rats ( $n = 5$ ) are not significantly different (paired  $t$  test;  $p = 0.480$  for 10–90% rise times and  $p = 0.180$  for decay times). **C**, The plot of amplitude of unitary eEPSC<sub>KA</sub> versus time shows that 1  $\mu\text{M}$  DCGIV (mGluR2/3 agonist) does not change their amplitude but increases their failure rate (see also **D**). **D**, Bar graphs of the mean failure rate of unitary eEPSC<sub>KA</sub> calculated before (Cont.), during, and after (wash) application of 1  $\mu\text{M}$  DCGIV. Note that the mGluR2/3 agonist significantly increases the failure rate of eEPSC<sub>KA</sub> ( $***p < 0.001$ ;  $n = 6$ ). **E**, **F**, Consecutive traces of unitary eEPSC<sub>KA</sub> ( $n = 10$ ) minimally stimulated at 0.2, 1, and 10 Hz (**E**) and bar graphs of the mean failure rate of these events calculated for each frequency (**F**; 50 stimulations for each frequency in 6 cells) show that increasing the stimulation rate from 0.2 to 1 Hz resulted in a significant reduction of failures ( $*p < 0.05$ ); increasing the frequency of stimulation from 1 to 10 Hz does not further decrease the failure rate ( $p > 0.05$ ).

synaptic transmission at mossy fiber synapses (Weisskopf et al., 1994). Miniature non-NMDAR-mediated EPSCs were recorded in the presence of TTX (1  $\mu\text{M}$ ), bicuculline (10  $\mu\text{M}$ ), and D-APV (40  $\mu\text{M}$ ). Bath application of FSK (10  $\mu\text{M}$ ) induced a gradual and long-lasting increase in the frequency of mEPSCs to  $380 \pm 59\%$  of control (Fig. 6A,B) (paired  $t$  test;  $p = 0.016$ ;  $n = 5$ ) without significant change in amplitude (see Fig. 6D for the distribution) ( $116 \pm 18\%$  of control; paired  $t$  test;  $p = 0.508$ ;  $n = 5$ ). The frequency analysis of mEPSC<sub>KA</sub> and mEPSC<sub>AMPA</sub> using our kinetic limits showed that both were significantly enhanced 20 min after FSK application (Fig. 6A,C) (to  $433 \pm 75\%$  of control, paired  $t$  test,  $p = 0.035$  for mEPSC<sub>KA</sub>; to  $350 \pm 48\%$  of control, paired  $t$  test,  $p = 0.009$  for mEPSC<sub>AMPA</sub>;  $n = 5$  for each). Thus, mEPSC<sub>KA</sub>s are highly sensitive to FSK application, and this further supports the mossy fiber origin of these events. These results also suggest that mossy fibers generate EPSC<sub>AMPA</sub>, as reported previously (Okazaki and Nadler, 2001).

To confirm that recurrent mossy fibers generated EPSC<sub>AMPA</sub> in addition to EPSC<sub>KA</sub>, we selectively stimulated dentate GCs using focal pressure application of the nonhydrolyzable glutamate agonist KA to the molecular layer while recording from a distant GC (Fig. 7A) (Wuarin and Dudek, 1996). Methylene blue was routinely added to the agonist solution to visualize the flow during pressure application and evaluate the spatial extent of the

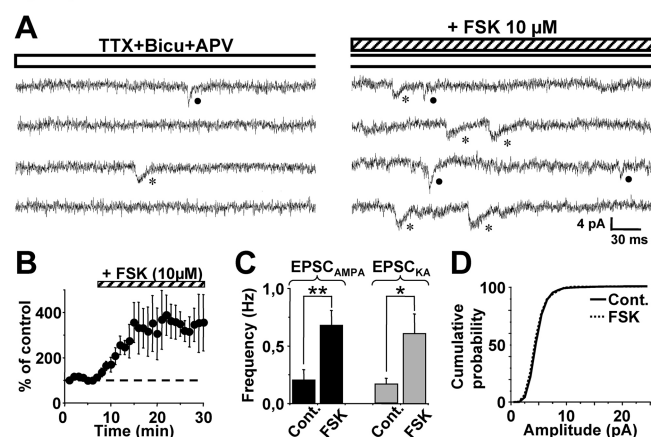
stimulation. Distribution of the ink typically indicated a diffusion of  $\sim 150 \mu\text{M}$  from the tip of the pipette. We also used a high divalent cation-containing medium ( $\text{Ca}^{2+}$  8 mM), which blocked polysynaptic activities (Berry and Pentreath, 1976), to avoid unspecific spread of activity. Pressure application of KA (30  $\mu\text{M}$ ; 20–50 ms duration) directly on the recorded GC in the presence of D-APV (40  $\mu\text{M}$ ) and bicuculline (10  $\mu\text{M}$ ) generated an inward current that lasted for several seconds (typically  $\sim 60$  s) (Fig. 7A). Focal applications of KA with a micropipette placed in the molecular layer of the dentate gyrus from a pilocarpine-treated rat, but at a distance of  $\geq 300 \mu\text{M}$  from the recorded cell, increased the frequency of EPSCs (in 7 of 28 GCs) without underlying current (Fig. 7B). This effect lasted between 30 and 60 s (i.e., in the same range as the current evoked when applying KA directly on the recorded cell) (Fig. 7A). The frequency analysis of EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>KA</sub> showed that both were significantly enhanced (Fig. 7C,D) (to  $264 \pm 58\%$  of control, paired  $t$  test,  $p = 0.04$  for EPSC<sub>AMPA</sub>; to  $244 \pm 35\%$  of control, paired  $t$  test,  $p = 0.004$  for EPSC<sub>KA</sub>;  $n = 7$  for each). Similar stimulations in the molecular layer of the dentate gyrus from control rats failed to change the frequency of EPSCs in distant recorded dentate GCs ( $n = 20$ ; data not shown) as described previously (Wuarin and Dudek, 1996). Therefore, the recurrent mossy fibers generated EPSC<sub>AMPA</sub> in addition to EPSC<sub>KA</sub> in dentate granule cells from epileptic rats.

To test the specificity of these responses, we determined whether spontaneous EPSC<sub>KA</sub>s could also be generated by mossy cells that may survive the pilocarpine-induced status epilepticus (Scharfman et al., 2001). Using an antibody against GluR2/3 to label mossy cells in the hilar region (Leranth et al., 1996), we found that some glutamatergic hilar mossy cells survived the status epilepticus (33–47%) (supplemental Fig. S2A, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material) as described previously (Scharfman et al., 2001). Using the same focal stimulation protocol in the hilus (supplemental Fig. S2B, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material), we observed an increase in the frequency of EPSCs in GCs ( $n = 7$  of 15) (supplemental Fig. S2C, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material) during 30–60 s. However, only EPSC<sub>AMPA</sub> frequency was significantly increased (to  $533 \pm 211\%$  of control;  $n = 7$ ; paired  $t$  test;  $p = 0.024$ ); the frequency of EPSC<sub>KA</sub> was not changed ( $107 \pm 23\%$  of control;  $n = 7$ ; paired  $t$  test;  $p = 0.855$ ) (supplemental Fig. S2D,E, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). As expected, in control hippocampal slices, similar stimulations in the hilus enhanced the frequency of EPSC<sub>AMPA</sub> to  $439 \pm 136\%$  of control ( $n = 3$  of 4 GCs) (data not shown).

Altogether, these experiments showed that recurrent mossy fibers generate both EPSC<sub>KA</sub>s and EPSC<sub>AMPA</sub>s in dentate granule cells from pilocarpine-treated rats.



## Epileptic Rat



**Figure 6.** FSK induces a long-lasting enhancement of the frequency of mEPSC<sub>KA</sub> and mEPSC<sub>AMPA</sub> in granule cells from epileptic rats. **A**, mEPSC recordings in the presence of 1  $\mu$ M TTX, 10  $\mu$ M bicuculline (Bicu), and 40  $\mu$ M D-APV in a granule cell from an epileptic rat in the absence (left) and 20 min after the application of 10  $\mu$ M FSK (right). Note that in the presence of FSK, the frequency of both mEPSC<sub>AMPA</sub> (filled circle) and mEPSC<sub>KA</sub> (asterisk) is increased. **B**, Time course of the FSK effect on the mean frequency of miniature events ( $n = 5$ ). **C**, Bar graphs of the mean frequency of mEPSC<sub>AMPA</sub> and mEPSC<sub>KA</sub> recorded before (Cont.) and 20 min after the application of FSK. The frequency of mEPSC<sub>KA</sub> and mEPSC<sub>AMPA</sub> is significantly increased ( $n = 5$ ;  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ). **D**, Cumulative probability plots of amplitudes of miniature EPSCs before (solid line) and 20 min after (dotted line) FSK application. Note that there is no significant difference in the amplitudes of mEPSCs before and 20 min after FSK application.

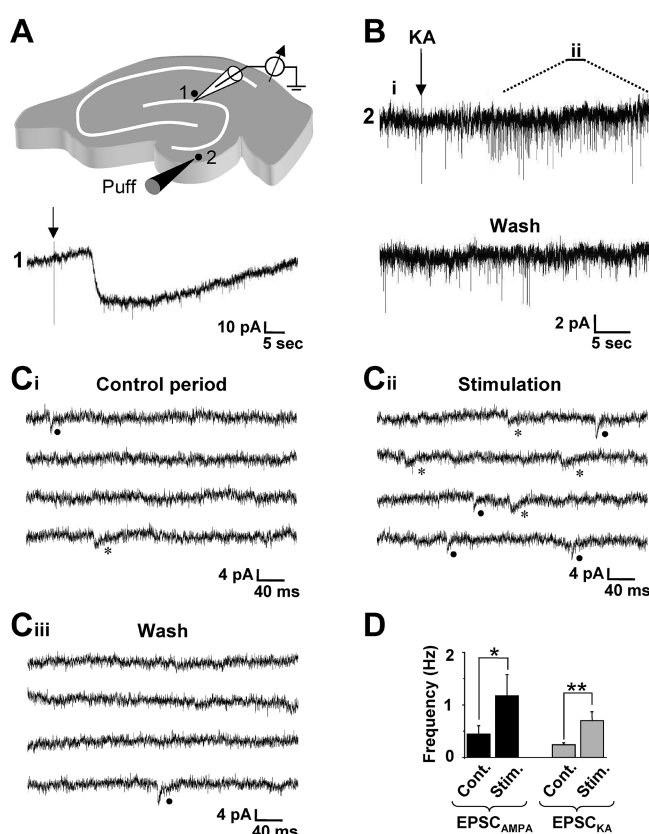
## Blockade of kainate receptors reduces synchronized network-driven activities in the dentate gyrus from epileptic rats

Because mossy fiber sprouting leads to the formation of a recurrent excitatory circuit between GCs in epileptic rats (Tauck and Nadler, 1985; Wuarin and Dudek, 1996; Molnar and Nadler, 1999; Buckmaster et al., 2002; Scharfman et al., 2003) that support synchronized burst discharges (Patrylo and Dudek, 1998; Hardison et al., 2000; Okazaki and Nadler, 2001), we then determined whether blockade of KARs could reduce recurrent mossy fiber network-driven activities. To test this hypothesis, synchronized burst discharges were evoked by antidromic stimulation of the mossy fiber pathway in the CA3b area in high potassium containing ACSF (6 mM) in the continuous presence of bicuculline (Fig. 8A) (10  $\mu$ M) (Patrylo and Dudek, 1998; Hardison et al., 2000) while recording local field potentials in the dentate granular layer. In these conditions, we were able to evoke burst activities in 9 of 10 slices from epileptic rats but in none of the nine control slices tested (Fig. 8B). We used the coastline burst index to quantify the involvement of KARs in burst discharges (Dingle et al., 1986). Desensitization of KARs using SYM 2081 (10  $\mu$ M) significantly reduced the coastline burst index in eight of nine tested slices to  $56.8 \pm 4.58\%$  of control condition (Fig. 8B) ( $n = 682$  bursts; Wilcoxon;  $p = 0.008$ ) without affecting the initial population spike ( $100 \pm 6.08\%$  of control;  $n = 9$ ; Wilcoxon;  $p = 0.82$ ). Thus, KARs are involved in synchronized network-driven activities supported by recurrent mossy fibers in the dentate gyrus from epileptic rats.

## Discussion

The main result of this study is that mossy fiber sprouting in epilepsies induces the formation of functional aberrant synapses on GCs of the dentate gyrus that are endowed with an important KAR-mediated synaptic component absent in control cells. Indeed, whereas control GCs have only a fast EPSC<sub>AMPA</sub>, GCs from

## Epileptic Rat

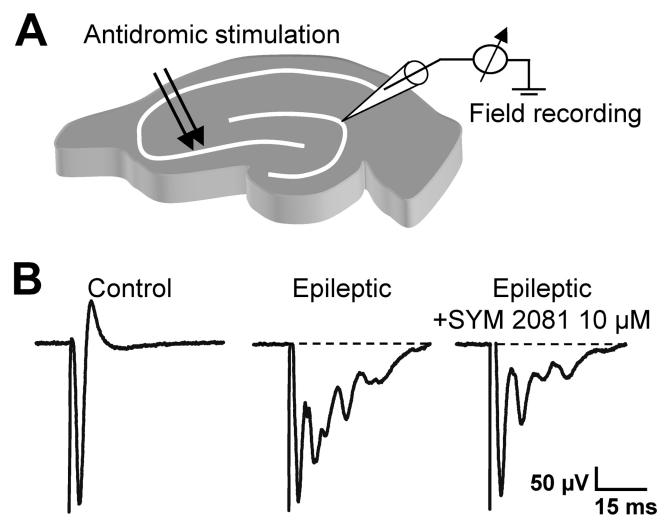


**Figure 7.** Focal stimulation in the dentate gyrus evokes both AMPA and kainate receptor-mediated EPSCs in granule cells from epileptic rats. **A**, Drawing of a hippocampal slice depicting the position of the recording pipette and the locus for focal application (puff; 50 ms duration) of 30  $\mu$ M kainate (KA; top). Focal application of kainate on the recorded dentate granule cell (1) induces a long-lasting inward current (bottom). **B**, Puff application of KA (arrow) induces an increase in the frequency of spontaneous EPSCs in a distant recorded granule cell. **C**, Enlargement of the recording shown in **B** enables the identification of spontaneous EPSC<sub>AMPA</sub> (filled circle) and EPSC<sub>KA</sub> (asterisk) before (**C<sub>i</sub>**, Control period) and after (**C<sub>ii</sub>**, Stimulation) the distant application of kainate. The frequency of both EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>KA</sub> is increased. This effect is reversible (**C<sub>iii</sub>**, Wash). Traces are consecutive in **C<sub>i</sub>**, **C<sub>ii</sub>**, and **C<sub>iii</sub>** and correspond to the i, ii, and wash periods indicated in **B**. **D**, Bar graphs of the mean frequency of spontaneous EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>KA</sub> recorded before (Cont.) and during (Stim.) the stimulation period (60 s). The frequency of both EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>KA</sub> is significantly increased ( $n = 7$  stimulations in 7 cells;  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ).

epileptic rats have, in addition to fast EPSC<sub>AMPA</sub>, slower EPSC<sub>KA</sub> that provide as much as half of the total spontaneous synaptic glutamatergic currents. This is, to the best of our knowledge, the first demonstration of formation of novel KAR-operated synapses on aberrant targets in pathological conditions.

## Mossy fiber origin of EPSC<sub>KA</sub>

In the control hippocampus, mossy fiber synapses display both presynaptic- and postsynaptic-specific features (Henze et al., 2000). On the presynaptic side, these synapses are downregulated by the activation of mGluR2/3 receptors (Kamiya et al., 1996) and present a specific form of frequency facilitation (Salin et al., 1996) via the activation of presynaptic KARs (Schmitz et al., 2001); on the postsynaptic side, mossy fiber synapses onto CA3 pyramidal cells selectively generate EPSC<sub>KA</sub> (Castillo et al., 1997; Cossart et al., 2002). Previous studies have shown that presynaptic features of mossy fibers are preserved after sprouting in the epileptic hippocampus (Feng et al., 2003). We now report that, in addition to



**Figure 8.** Desensitization of kainate receptors reduces synchronized burst discharges in granule cells from epileptic rats. **A**, Drawing of a hippocampal slice depicting the position of the extracellular recording pipette (granule cell layer) and the stimulating electrode (arrows, lucidum of CA3b to antidromically stimulate granule cells). Experiments were performed in 6 mM  $K^+$  containing ACSF and 10  $\mu$ M bicuculline. **B**, Digitally averaged traces showing that antidromic stimulations of mossy fibers evoke a single population spike (61 averaged traces, left) in a control slice, and a population spike followed by an interictal burst discharge (67 averaged traces; middle) in a slice from an epileptic rat. Note that bath application of 10  $\mu$ M SYM 2081 (which desensitizes KARs) reduces the severity of the burst discharge in the epileptic slice (as shown by 67 averaged traces; right).

these presynaptic features, recurrent mossy fibers also conserve their postsynaptic specificity, because they generate EPSC<sub>KA</sub>: (1) EPSC<sub>KA</sub> are recorded in chronic epileptic rats that showed strong mossy fiber sprouting but not in control or 4- to 5-d-poststatus epilepticus rats that showed no mossy fiber sprouting; (2) in chronic epileptic rats, EPSC<sub>KA</sub> can be evoked by minimal stimulation in the inner molecular layer of the dentate gyrus, the terminal zone of recurrent mossy fibers; (3) these unitary EPSC<sub>KA</sub>s show pharmacological and physiological features specific of mossy fiber synapses such as sensitivity to DCGIV and forskolin and frequency-dependent facilitation; (4) EPSC<sub>KA</sub> can be generated by the focal stimulation of distant GCs but not hilar mossy cells; and (5) blockade of KARs reduce recurrent mossy fiber network-driven activities. These results suggest that the establishment of new KAR-operated synapses in GCs from epileptic rats is triggered by the arrival of mossy fiber axons as shown previously for CA3 pyramidal cells during development (Marchal and Mulle, 2004). This reinforces and extends the unique relationship between mossy fibers and KAR-operated synapses (Monaghan and Cotman, 1982; Represa et al., 1987; Castillo et al., 1997; Vignes and Collingridge, 1997; Mulle et al., 1998; Cossart et al., 2002; Marchal and Mulle, 2004). Postsynaptic KARs, unlike the widespread expression of postsynaptic AMPARs, are expressed in specific cell types (Huettner, 2003; Lerma, 2003). Among principal cells of the control hippocampus, only CA3 pyramidal cells use KARs as postsynaptic mediators of ionotropic glutamatergic transmission (Lerma, 2003). Additionally, our results show that mossy fiber sprouting induces a reorganization of KAR-mediated synaptic transmission in the hippocampus of chronic epileptic rats.

#### Properties of aberrant EPSC<sub>KA</sub>

The EPSC<sub>KA</sub>s generated in GCs in chronic epileptic rats share common physiological features with EPSC<sub>KA</sub> described in CA3

pyramidal cells and CA1 interneurons in the control hippocampus (Cossart et al., 2002). KARs in GCs from epileptic rats can be activated by the quantal release of glutamate, because we were able to pharmacologically isolate miniature EPSC<sub>KA</sub> and to minimally evoke these events. These unitary events display a slow time course and a small amplitude when compared with EPSC<sub>AMPA</sub> (Castillo et al., 1997; Vignes and Collingridge, 1997; Frerking et al., 1998; Cossart et al., 2002). Their slow time course is most likely attributable to intrinsic features of KARs as observed in other systems (Lerma, 2003) and not to changes of intrinsic membrane properties of GCs after epilepsy. Accordingly, the kinetics of EPSC<sub>AMPA</sub> was not significantly different in epileptic and control GCs. Furthermore, we show that focal GC stimulations or minimal stimulations of recurrent mossy fibers evoked either slow KAR- or fast AMPAR-mediated EPSCs but not mixed AMPAR/KAR-mediated EPSCs. These observations suggest that, in epileptic GCs, AMPARs and KARs are likely to be clustered into different mossy fiber synapses in contrast to control CA3 pyramidal cells in which most KARs are colocalized with AMPARs (Cossart et al., 2002).

#### Implications for temporal lobe epilepsy

Previous studies emphasized the role of KARs in epileptiform activities induced by acute administration of convulsant agents *in vitro* or *in vivo* (Ben-Ari, 1985; Gaiarsa et al., 1994; Mulle et al., 1998; Ben-Ari and Cossart, 2000; Smolders et al., 2002; Rogawski et al., 2003) and in particular the effects of kainate administration that trigger a seizure and brain damage syndrome that mimics human TLE (Ben-Ari, 1985). In the present study, we were concerned by the fate of KAR-mediated synaptic transmission in chronic epileptic rats that developed spontaneous behavioral seizures. In animal models and in patients with TLE, mossy fiber sprouting leads to the formation of a functional recurrent excitatory circuit between granule cells (Tauck and Nadler, 1985; Wuarrin and Dudek, 1996; Molnar and Nadler, 1999; Buckmaster et al., 2002; Scharfman et al., 2003) that support epileptiform bursts (Patrylo and Dudek, 1998; Hardison et al., 2000; Gabriel et al., 2004). Mossy fiber sprouting occurs as a compensatory mechanism to the death of hilar mossy cells and the resulting loss of glutamatergic inputs in the inner molecular layer of the dentate gyrus. Our results show that the overall frequency of mEPSCs in GCs is not significantly different between control and chronic epileptic animals, suggesting that mossy fiber sprouting quantitatively compensates for the loss of glutamatergic excitatory inputs. Despite this quantitative compensation, we found a profound change between GCs from control and chronic epileptic rats, because only the latter use KARs as postsynaptic mediators of ionotropic glutamatergic synaptic transmission. What could be the functional consequences of this change? Because EPSC<sub>KA</sub> from recurrent mossy fibers represent half of the glutamatergic currents, activation of KARs in addition to AMPARs (Okazaki et al., 2001) should contribute to the epileptiform bursts supported by the recurrent mossy fiber network. Although additional studies are required to substantiate this, the inhibitory effect of a selective KAR blocker on synchronized activities generated by the recurrent mossy fiber network is in keeping with this hypothesis. These observations, together with previous studies, are compatible with an anti-epileptic strategy based on kainate receptor antagonists. Furthermore, the present observations show that the functional consequences of reactive plasticity on glutamatergic synaptic transmission should not only be evaluated in terms of quantitative changes but also qualitative changes. Indeed, whereas control GCs of the dentate gyrus have only fast

EPSC<sub>AMPA</sub>, GCs from epileptic rats have fast EPSC<sub>AMPA</sub> and slower EPSC<sub>Ka</sub>. Computing studies have shown that EPSC<sub>AMPA</sub> and EPSC<sub>Ka</sub> encode different features of afferent activity (Frerking and Ohliger-Frerking, 2002): EPSC<sub>Ka</sub>s, with slow kinetics, generate a large tonic depolarization when activated by afferent inputs, whereas EPSC<sub>AMPA</sub>s conserve the temporal structure of the signal. Thus, the activation of both AMPARs and KARs at recurrent mossy fiber synapses would greatly modify the computational properties of these cells.

In conclusion, we show that, in addition to axonal rewiring, mossy fiber sprouting induces a reorganization of KAR-mediated synaptic transmission in the hippocampus from chronic epileptic rats together with a shift in the nature of glutamatergic transmission in GCs. This, together with other alterations that occur in the hippocampus (Nadler, 2003), might be important for the pathogenesis of temporal lobe epilepsy.

## References

- Ascher P, Nowak L (1988) The role of divalent-cations in the *N*-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons in culture. *J Physiol (Lond)* 399:247–266.
- Ben-Ari Y (1985) Limbic seizure and brain-damage produced by kainic acid—mechanisms and relevance to human temporal-lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375–403.
- Ben-Ari Y, Cossart R (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23:580–587.
- Ben-Ari Y, Represa A (1990) Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fiber sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 13:312–318.
- Berry MS, Pentreath VW (1976) Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission. *Brain Res* 105:1–20.
- Buckmaster PS, Dudek FE (1999) In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. *J Neurophysiol* 81:712–721.
- Buckmaster PS, Zhang GF, Yamawaki R (2002) Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *J Neurosci* 22:6650–6658.
- Bureau I, Bischoff S, Heinemann SF, Mulle C (1999) Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J Neurosci* 19:653–663.
- Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388:182–186.
- Cossart R, Esclapez M, Hirsch JC, Bernard C, Ben Ari Y (1998) GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1:470–478.
- Cossart R, Epszstein J, Tyzio R, Becq H, Hirsch J, Ben Ari Y, Crepel V (2002) Quantal release of glutamate generates pure kainate and mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons. *Neuron* 35:147–159.
- DeVries SH, Schwartz EA (1999) Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and “off” bipolar cells in a mammalian retina. *Nature* 397:157–160.
- Dingledine R, Hynes MA, King GL (1986) Involvement of *N*-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the rat hippocampal slice. *J Physiol (Lond)* 380:175–189.
- Feng L, Molnar P, Nadler JV (2003) Short-term frequency-dependent plasticity at recurrent mossy fiber synapses of the epileptic brain. *J Neurosci* 23:5381–5390.
- Franck JE, Pokorny J, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1995) Physiological and morphologic characteristics of granule cell circuitry in human epileptic hippocampus. *Epilepsia* 36:543–558.
- Fremaux J, Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27:98–103.
- Frerking M, Nicoll RA (2000) Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 10:342–351.
- Frerking M, Ohliger-Frerking P (2002) AMPA receptors and kainate receptors encode different features of afferent activity. *J Neurosci* 22:7434–7443.
- Frerking M, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat Neurosci* 1:479–486.
- Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, Merschhemke M, Sanabria ER, Eilers A, Kivi A, Zeller M, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U, Lehmann TN (2004) Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci* 24:10416–10430.
- Gaiarsa JL, Zagrean L, Ben Ari Y (1994) Neonatal irradiation prevents the formation of hippocampal mossy fibers and the epileptic action of kainate on rat CA3 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 71:204–215.
- Hardison JL, Okazaki MM, Nadler JV (2000) Modest increase in extracellular potassium unmasks effect of recurrent mossy fiber growth. *J Neurophysiol* 84:2380–2389.
- Henze DA, Urban NN, Barrionuevo G (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98:407–427.
- Huettnner JE (2003) Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 70:387–407.
- Isokawa M, Levesque MF, Babb TL, Engel J (1993) Single mossy fiber axonal systems of human dentate granule cells studied in hippocampal slices from patients with temporal-lobe epilepsy. *J Neurosci* 13:1511–1522.
- Kamiya H, Shinozaki H, Yamamoto C (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *J Physiol (Lond)* 493:447–455.
- Leranth C, Szeideemann Z, Hsu M, Buzsaki G (1996) AMPA receptors in the rat and primate hippocampus: a possible absence of GLUR2/3 subunits in most interneurons. *Neuroscience* 70:631–652.
- Jerma J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 4:481–495.
- Li H, Rogawski MA (1998) GluR5 kainate receptor mediated synaptic transmission in rat basolateral amygdala in vitro. *Neuropharmacology* 37:1279–1286.
- Li P, Wilding TJ, Kim SJ, Calejesan AA, Huettnner JE, Zhuo M (1999) Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature* 397:161–164.
- Lynch M, Sutula T (2000) Recurrent excitatory connectivity in the dentate gyrus of kindled and kainic acid-treated rats. *J Neurophysiol* 83:693–704.
- Marchal C, Mulle C (2004) Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *J Physiol (Lond)* 561:27–37.
- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34:985–995.
- Molnar P, Nadler JV (1999) Mossy fiber-granule cell synapses in the normal and epileptic rat dentate gyrus studied with minimal laser photostimulation. *J Neurophysiol* 82:1883–1894.
- Monaghan DT, Cotman CW (1982) The distribution of [<sup>3</sup>H]kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res* 252:91–100.
- Mulle C, Sailer A, Perez-Otano I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, Maron C, Gage FH, Mann JR, Bettler B, Heinemann SF (1998) Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392:601–605.
- Nadler JV (2003) The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochemical Res* 28:1649–1658.
- Okazaki MM, Nadler JV (2001) Glutamate receptor involvement in dentate granule cell epileptiform activity evoked by mossy fiber stimulation. *Brain Res* 915:58–69.
- Okazaki MM, Evenson DA, Nadler JV (1995) Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats—visualization after retrograde transport of biocytin. *J Comp Neurol* 352:515–534.
- Patrylo PR, Dudek FE (1998) Physiological unmasking of new glutamatergic pathways in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-induced epileptic rats. *J Neurophysiol* 79:418–429.
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281–294.
- Represa A, Tremblay E, Ben Ari Y (1987) Kainate binding-sites in the hippocampal mossy fibers—localization and plasticity. *Neuroscience* 20:739–748.
- Represa A, Robain O, Tremblay E, Ben Ari Y (1989) Hippocampal plasticity in childhood epilepsy. *Neurosci Lett* 99:351–355.
- Represa A, Jorquera I, Lasalle GL, Ben Ari Y (1993) Epilepsy induced collateral sprouting of hippocampal mossy fibers—does it induce the development of ectopic synapses with granule cell dendrites. *Hippocampus* 3:257–268.

- Rogawski MA, Gryder D, Castaneda D, Yonekawa W, Banks MK, Lia H (2003) GluR5 kainate receptors, seizures, and the amygdala. *Ann NY Acad Sci* 985:150–162.
- Salin PA, Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13304–13309.
- Scharfman HE, Smith KL, Goodman JH, Sollas AL (2001) Survival of dentate hilar mossy cells after pilocarpine-induced seizures and their synchronized burst discharges with area CA3 pyramidal cells. *Neuroscience* 104:741–759.
- Scharfman HE, Sollas AL, Berger RE, Goodman JH (2003) Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting. *J Neurophysiol* 90:2536–2547.
- Schmitz D, Mellor J, Nicoll RA (2001) Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* 291:1972–1976.
- Smolders I, Bortolotto ZA, Clarke VR, Warre R, Khan GM, O'Neill MJ, Ornstein PL, Bleakman D, Ogden A, Weiss B, Stables JP, Ho KH, Ebinger G, Collingridge GL, Lodge D, Michotte Y (2002) Antagonists of GLU(K5)-containing kainate receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. *Nat Neurosci* 5:796–804.
- Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G (1988) Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional-activity. *Science* 239:1147–1150.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal-lobe. *Ann Neurol* 26:321–330.
- Tauk DL, Nadler JV (1985) Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal-formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* 5:1016–1022.
- Vignes M, Collingridge GL (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388:179–182.
- Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, Nicoll RA (1994) Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic-AMP. *Science* 265:1878–1882.
- Wuarin JP, Dudek FE (1996) Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. *J Neurosci* 16:4438–4448.
- Wuarin JP, Dudek FE (2001) Excitatory synaptic input to granule cells increases with time after kainate treatment. *J Neurophysiol* 85:1067–1077.

## Discussion Générale



Notre travail montre que les récepteurs KA post-synaptiques peuvent être activés par les quanta de glutamate libérés lors de la transmission synaptique miniature ou lors de stimulations minimales des fibres glutamatergiques. Ces résultats permettent de mieux comprendre les caractéristiques des EPSC<sub>KA</sub> notamment en terme de cinétique et d'amplitude et de montrer que l'activation des récepteurs KA peut avoir des conséquences fonctionnelles importantes dans des conditions de faible activité du réseau hippocampique. Nos résultats montrent également que l'expression de récepteurs KA post-synaptiques par une cellule peut être modifiée chez des rats épileptiques chroniques. Dans ces conditions, l'activation des récepteurs KA post-synaptiques pourrait avoir des conséquences pathologiques.

### 1. Cinétique lente et amplitude faible des EPSC<sub>KA</sub>

La genèse d'événements lents au niveau des synapses moussues est en contradiction avec les résultats de Jonas et al. (1993). Ces auteurs avaient utilisé des applications locales d'une solution concentrée de sucrose pour activer sélectivement les fibres moussues et étudier ainsi les propriétés quantiques des événements moussus. Ils avaient décrit uniquement des événements ayant une cinétique rapide (rise time de 0.6 ms et decay time de 6.2 ms) mais aucun événement ayant une composante cinétique lente telle que celle observée au niveau des EPSC<sub>AMPA/KA</sub>. Cette différence entre nos résultats et les leurs peut venir du fait que ces auteurs ont imposé un critère cinétique pour la sélection des événements synaptiques moussus (rise time inférieur à 1 ms), ce qui les a sans doute conduit à exclure un certain nombre d'EPSC ayant des cinétiques plus lentes (Jonas et al., 1993). Nos résultats sont plus en accord avec les travaux de Henze et al. (1997). Ces auteurs ont utilisé un modèle d'irradiation néonatale pour empêcher le développement des fibres moussues et ont corrélé cette absence avec la disparition d'une sous population d'événements ayant une cinétique lente (Henze et al., 1997).

#### *Cinétique lente et localisation extra-synaptique des récepteurs kainate*

La cinétique lente et l'amplitude faible des EPSC<sub>KA</sub>, associées à la nécessité de recourir à des stimulations fortes et/ou à haute fréquence des fibres afférentes pour les

observer, avait conduit à la conclusion que les récepteurs KA synaptiques n'étaient pas localisés dans la fente synaptique, directement en face des zones actives, mais plus loin au niveau péri- ou extra-synaptique (Frerking and Nicoll, 2000; Lerma et al., 2001). Si cette hypothèse est vraie, des modifications de la vitesse de diffusion du glutamate en dehors de la fente synaptique ou des modifications de la vitesse de recapture du glutamate devraient affecter différemment les EPSC<sub>AMPA</sub> et les EPSC<sub>KA</sub>. Cette hypothèse a été testée par différents groupes. Au niveau des EPSC<sub>KA</sub> évoqués dans les cellules pyramidales de CA3 par stimulation répétitive des fibres moussues, Min et al (1998) rapportent qu'un ralentissement de la diffusion du glutamate par ajout de dextran dans le milieu extracellulaire augmente l'amplitude sans affecter la cinétique des événements. Donc, l'accumulation de glutamate lors de ces stimulations répétitives participe à l'amplitude mais pas à la cinétique des EPSC<sub>KA</sub> (Min et al., 1998). Au niveau des EPSC<sub>KA</sub> évoqués dans les cellules de Golgi par stimulation des fibres afférentes, Bureau et al (2000) montrent que le blocage des transporteurs responsables de la recapture du glutamate, ne modifie ni le *rise time* ni la première phase du *decay time* des EPSC<sub>KA</sub> évoqués. Ces auteurs montrent également qu'un antagoniste compétitif des récepteurs AMPA/KA, inhibe de la même façon les phases précoces et tardives de l'EPSC<sub>KA</sub> évoqué. Comme l'efficacité de cet antagoniste dépend de la concentration en glutamate extracellulaire, si les récepteurs KA étaient localisés à des distances variables de la fente synaptique, cet antagoniste devrait inhiber différemment ces phases précoces et tardives (Bureau et al., 2000). Dans une autre étude au niveau des synapses thalamo-corticales en développement, Kidd et Isaac (2001) observent que le *decay time* des EPSC<sub>KA</sub> augmente lorsque les fibres afférentes sont stimulées à haute fréquence. Pour déterminer si ces changements de cinétique sont dus à une diffusion plus importante de glutamate au niveau extrasynaptique dans ces conditions, les auteurs comparent la cinétique de l'événement ainsi obtenu avec celle de l'événement obtenu après sommation (artificiellement obtenue par ordinateur) d'événements isolés évoqués à faible fréquence. Les cinétiques ne sont pas différentes entre ces deux types d'événements ce qui suggère que les différences de cinétique observées ne résultent que de la sommation temporelle des EPSC<sub>KA</sub> et non d'une plus grande diffusion du glutamate vers les domaines péri- ou extra-synaptiques. Ces auteurs montrent également qu'un inhibiteur de la recapture du glutamate n'a aucun effet sur la cinétique de l'EPSC<sub>KA</sub>. Mais ces expériences ont été réalisées à température ambiante à laquelle les transporteurs peuvent être peu ou pas fonctionnels. Pour écarter cette possibilité les auteurs se mettent à 35°C et observent une accélération des « *decay time* » des EPSC<sub>AMPA</sub> et des EPSC<sub>KA</sub> dans les mêmes proportions. L'ensemble de ces résultats suggère qu'une localisation

extra- ou péri-synaptique des récepteurs KA ne semble pouvoir expliquer la cinétique lente des EPSC<sub>KA</sub> (Kidd and Isaac, 2001).

#### *Autres facteurs permettant d'expliquer la cinétique lente des EPSC<sub>KA</sub>*

Nos données montrant que les récepteurs KAs post-synaptiques peuvent être activés par la libération quantique de glutamate sont en accord avec les résultats des travaux décrits dans le paragraphe précédent. Une étude récente est venue confirmer la localisation post-synaptique des récepteurs KA en utilisant de nouveaux anticorps dirigés contre les sous-unités KA1, KA2. L'utilisation de la microscopie électronique a permis de localiser très précisément la sous-unité KA2 au niveau de la densité post-synaptique des synapses moussues (Darstein et al., 2003). La sous-unité KA1 serait localisée préférentiellement au niveau pré-synaptique. Malgré la localisation post-synaptique des récepteurs KA, nos résultats montrent que les mEPSC<sub>KA</sub> sont en moyenne trois fois plus lents que les mEPSC<sub>AMPA</sub> enregistrés dans les mêmes cellules. Comment alors expliquer ces différences de cinétiques ? La cinétique des événements synaptiques dépend de plusieurs facteurs comme la durée de la libération des neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique, le profil temporel de la variation de la concentration en glutamate dans la fente synaptique, la cinétique de désactivation et/ou désensibilisation des récepteurs (Jonas, 2000). La durée de la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique dépend à son tour de nombreux facteurs pré-synaptiques tels que le profil temporel de la variation de la concentration en calcium au niveau pré-synaptique, des constantes d'affinité pour le calcium des protéines responsables de la fusion des vésicules, de la durée du potentiel d'action au niveau présynaptique (Geiger and Jonas, 2000), du mode de fusion des vésicules synaptiques (fusion complète ou partielle voir Pawlu et al., 2004), de la distance entre la vésicule et les canaux calciques (pour revue voir Schneggenburger and Neher, 2005). Le profil temporel de la variation en glutamate dans la fente synaptique dépend, indépendamment de son mode de libération de la géométrie de la synapse (Cathala et al., 2005), et de l'efficacité de la recapture du glutamate notamment par les astrocytes. Un nombre croissant de données montre que certains de ces facteurs (comme le type de canaux calciques présents au niveau pré-synaptique; Reid et al., 1997) peuvent varier en fonction des synapses que l'on considère. Ces facteurs pourraient en principe expliquer les différences observées entre les mEPSC<sub>AMPA</sub> et les mEPSC<sub>KA</sub> qui sont générés au niveau de synapses différentes. Dans nos travaux, l'examen des EPSC<sub>AMPA/KA</sub> obtenus après stimulation minimale des fibres moussues montre que les amplitudes de la composante rapide due à



l'activation des récepteurs AMPA et lente due à l'activation des récepteurs KA sont strictement corrélées (Cossart et al., 2002 ; Fig. 4B). Ce résultat suggère que les récepteurs AMPA et KA sont localisés au niveau de la même densité post-synaptique. Ainsi, les différences de cinétiques entre les composantes rapide et lente observées au niveau de ces événements ne peuvent s'expliquer par des différences de durée de libération de neurotransmetteur ou de profil temporel du glutamate dans la fente synaptique. Une explication alternative serait qu'au niveau du bouton synaptique moussu, la libération soit synchronisée entre différentes zones actives (Collin et al., 2005). Un tel mécanisme peut intervenir également lors de la libération miniature en présence de TTX par libération d'une quantité importante de calcium stocké au niveau du réticulum endoplasmique et serait à l'origine des événements miniature géants (Llano et al., 2000). Des études récentes montrent cependant que la stimulation de la libération du calcium stocké au niveau du réticulum endoplasmique ne modifie pas l'amplitude des EPSC évoqués par stimulation minimale des fibres moussues dans les cellules pyramidales de la région CA3 (Carter et al., 2002; Lauri et al., 2003). L'hypothèse de la synchronisation entre différentes zones actives au sein d'un bouton géant moussu a été proposée pour expliquer la survenue d'événements miniatures de grande amplitude (Henze et al., 1997; Henze et al., 2000). Cependant, tous les événements enregistrés après stimulation minimale des fibres moussues, indépendamment de leur amplitude, ont une cinétique double (Cossart et al., 2002). De plus, la synchronisation entre différentes zones actives libérant le glutamate au niveau de synapses ayant des propriétés différentes est difficile à reconcilier avec l'enregistrement d'une proportion importante de mEPSC<sub>AMPA/KA</sub> au niveau des interneurons de la région CA1 qui ne sont excités que par l'intermédiaire d'une seule zone active (Gulyas et al., 1993b).

Les différences de cinétique entre les dépolarisations induites par l'activation des récepteurs AMPA et KA pourraient s'expliquer par des propriétés différentes des récepteurs post-synaptiques. Cependant, les cinétiques de désensibilisation et de déactivation sont sensiblement les mêmes pour les récepteurs AMPA et KA en réponse à des applications rapides ou plus prolongées de leur agoniste naturel le glutamate. Comment alors expliquer les différences de cinétique observées entre les mEPSC<sub>AMPA</sub> et les mEPSC<sub>KA</sub>? La plupart des études concernant les propriétés fonctionnelles des récepteurs KA ont été réalisées au niveau de systèmes hétérologues, mais les propriétés fonctionnelles des récepteurs KA natifs pourraient être différentes. En effet, des expériences d'application prolongées d'agoniste au niveau des récepteurs KA natifs de neurones hippocampiques en culture rapportent des cinétiques de désensibilisation plus lente que dans les système hétérologues (11-13 ms ;

Paternain et al., 1998) et correspondant aux cinétiques des mEPSC<sub>KA</sub> enregistrés au niveau des interneurons de la région CA1. Ces valeurs sont cependant dix fois plus rapides que les cinétiques des EPSC<sub>KA</sub> enregistrés dans les cellules pyramidales de CA3 (voir ci-dessous). Les propriétés des récepteurs KA natifs pourraient être modifiées par interaction avec des protéines de la densité post-synaptique. Des expériences montrent en effet que la co-expression de sous-unités des récepteurs KA et d'une protéine de la densité post-synaptique, la SAP90, dans un système hétérologue entraîne un regroupement des récepteurs KA. Ces interactions modifient également les cinétiques des courants obtenus après application de glutamate en ralentissant la cinétique de désensibilisation (Garcia et al., 1998). Les études récentes de biologie structurale montrent que les domaines S1S2 des sous-unités des récepteurs KA s'associent en dimères et que la force de cette association est inversement corrélée à la désensibilisation (voir Chapitre III). Les sous-unités GluR5 et GluR6 présentent des liaisons hydrogènes entre ces dimères qui diffèrent de celles observées au niveau des récepteurs AMPA et les stabilisent (Mayer, 2005a). Ces différences pourraient expliquer les différentes modulations des cinétiques de désensibilisation des récepteurs KA par les protéines de la densité post-synaptique.

La modulation différentielle des récepteurs AMPA et KA par les cations extracellulaires pourrait également expliquer les différences de cinétiques observées. En effet, les cinétiques de désensibilisation des récepteurs KA, mais pas celles des récepteurs AMPA, sont influencées par la concentration en ions Na<sup>+</sup> extracellulaires (voir Chapitre III). Ainsi, pour une même concentration extracellulaire en ions Na<sup>+</sup> les récepteurs AMPA et KA peuvent avoir des cinétiques de désensibilisation différentes. Ces travaux montrent notamment que pour une concentration extracellulaire en ion Na<sup>+</sup> proche des celle que nous utilisons (150mM) les cinétiques de désensibilisation de récepteurs homomériques KA formé de la sous-unité GluR6 en réponse à des applications prolongées de glutamate sont deux fois plus lentes que les cinétiques de désensibilisation de récepteurs homomériques AMPA formés de la sous-unité GluR1 (Bowie, 2002). L'ensemble de ces propriétés pourrait expliquer les différences observées entre les cinétiques des mEPSC<sub>AMPA</sub> et mEPSC<sub>KA</sub>.

### *Différences de cinétiques intercellulaires*

Nos travaux montrent également que les mEPSC<sub>KA</sub> enregistrés dans les cellules pyramidales de la région CA3 ont un *decay time* dix fois plus lent que les mEPSC<sub>KA</sub> enregistrés dans les interneurons de la région CA1. Mais une différence de cinétique

identique a été observée pour les  $mEPSC_{AMPA}$  enregistrés dans ces deux types cellulaires. Les différences de cinétique observées pour les  $mEPSC_{AMPA}$  pourraient s'expliquer par des différences d'épissage alternatif au niveau des sous-unités qui forment ces récepteurs (Geiger et al., 1995). Les récepteurs AMPA formés de sous-unités sous leur forme flip ont en effet une cinétique de désensibilisation plus lente que ceux formés de sous-unités sous leur forme flop. Des études utilisant l'extraction des ARNm après enregistrement de cellules en configuration cellule entière ont permis de montrer que les sous-unités des récepteurs AMPA exprimées dans les cellules pyramidales de CA3 étaient majoritairement sous la configuration flip tandis que celles exprimées dans les interneurons du gyrus denté étaient majoritairement sous la configuration flop. Des travaux similaires concernant les récepteurs KA ont été réalisés à partir de neurones d'hippocampe en culture (Ruano et al., 1995). Ces travaux montrent que différents types cellulaires peuvent exprimer des sous-unités GluR6 ayant différents degrés d'édition et présentant des cinétiques de désensibilisation différentes en réponse à des applications prolongées de KA. Malheureusement, l'étude des cinétiques en réponse à des applications prolongées de glutamate ainsi que la nature des types cellulaires testés n'ont pu être déterminés. Une autre hypothèse serait que ces différences intercellulaires soient dues aux différences de propriétés passives des membranes entre les cellules. En effet, les constantes de temps sont beaucoup plus rapides dans les interneurons de la région CA1 que dans les cellules pyramidales de la région CA3. En accord avec ce résultat, les cinétiques des  $EPSC_{KA}$  enregistrés dans les cellules granulaires de rat épileptiques chroniques (qui ont des constantes de temps plus proches des interneurons) ont une cinétique correspondant à celle des  $EPSC_{KA}$  enregistrés au niveau des interneurons de CA1 (Epsztein et al., 2005).

#### *Amplitude faible des $EPSC_{KA}$*

Une dernière propriété partagée des  $mEPSC_{KA}$  que nous avons retrouvé dans tous les types cellulaires étudiés est leur amplitude plus faible en comparaison des  $mEPSC_{AMPA}$  enregistrés au niveau des mêmes cellules. Cette différence est, encore une fois, difficile à expliquer en regard des résultats obtenus au niveau des systèmes hétérologues et des données structurales montrant que le glutamate entraîne une fermeture plus grande au niveau des domaines S1S2 des récepteurs KA que des récepteurs AMPA ce qui suggère un meilleur couplage entre fixation et ouverture du canal. Les travaux de Frerking et Nicolls réalisés au niveau des interneurons de la région CA1 ne révèlent aucune différence dans les propriétés pré-synaptiques entre les  $EPSC_{AMPA}$  et  $EPSC_{KA}$  (Frerking et al., 1998). Nos résultats montrant

que ces différences d'amplitude sont retrouvées au niveau d'événements doubles miniatures sont en accord avec ces résultats. Ces différences en terme d'amplitude peuvent s'expliquer par les différences de cinétique de resensibilisation observées entre les récepteurs AMPA et KA. En effet, les récepteurs KA restent beaucoup plus longtemps désensibilisés que les récepteurs AMPA. Cette propriété, associée au fait que les concentrations de glutamate nécessaires à la désensibilisation des récepteurs KA soient beaucoup faibles que celles nécessaires à leur activation pourrait résulter en le fait que la plupart des récepteurs KA soient désensibilisés dans des conditions basales d'activation contrairement aux récepteurs AMPA (Lerma et al., 2001). Ainsi, l'activation des récepteurs AMPA et KA par les mêmes concentrations de glutamate pourrait produire des réponses ayant des amplitudes sensiblement différentes telles que celles observées au niveau des  $mEPSC_{AMPA/KA}$ . Si cette hypothèse est vraie, les récepteurs KA activés dans ces conditions seraient plus résistants à la désensibilisation ce qui pourrait également expliquer en partie les cinétiques plus lentes des  $EPSC_{KA}$ .

## 2. Implications fonctionnelles dans le tissu sain

La taille et la forme des événements synaptiques excitateurs déterminent le nombre d'événements synaptiques nécessaires pour atteindre le seuil de décharge des potentiels d'action et la fenêtre temporelle permettant la sommation des événements synaptiques. Les premiers travaux concernant les récepteurs KA post-synaptiques ont montré que les  $EPSC_{KA}$  pouvaient se sommer en réponse à des stimulations à haute fréquence (100 Hz; Castillo et al., 1997b; Vignes and Collingridge, 1997). Ces observations avaient conduit à l'hypothèse que les  $EPSC_{AMPA}$  et les  $EPSC_{KA}$  pouvaient coder différents aspects de l'information afférente. Les  $EPSC_{AMPA}$  avec leur cinétique rapide peuvent coder la synchronie entre les potentiels d'actions afférents tandis que les  $EPSC_{KA}$ , avec leur cinétique lente, peuvent coder la fréquence des trains de potentiels d'actions pré-synaptiques (Frerking and Nicoll, 2000; König et al., 1996). Des expériences de simulations ont par la suite montré que cette hypothèse était plausible. Dans ce modèle, les  $EPSC_{AMPA}$  permettent de garder la structure temporelle de l'information afférente tandis que les  $EPSC_{KA}$ , en se sommant, entraînent une dépolarisation durable de la cellule post-synaptique pendant un train de potentiel d'action (Frerking and Ohligre-Frerking, 2002).

### *Au niveau des fibres moussues dans la région CA3*

Des études *in vivo* montrent que les cellules granulaires déchargent la plupart du temps à une fréquence très faible (inférieure à 1Hz) mais que cette fréquence peut augmenter sensiblement lorsque l'animal entre dans le domaine spatial codé par une cellule granulaire (entre 10 et 40 Hz ;Henze et al., 2002; Jung and McNaughton, 1993). Une étude récente utilisant des enregistrements de paires connectées cellule granulaire-cellule pyramidale de CA3 montre que lorsque les cellules granulaires déchargent à 10 Hz, chaque EPSP est suivi d'un IPSP (due à l'activation par les fibres moussues des interneurons du stratum lucidum : *feed forward inhibition*) qui raccourcit son décours temporel et la cellule pyramidale n'est pas sensiblement dépolarisée. Dans ces conditions, on peut imaginer que les différences de cinétique entre les événements synaptiques dus à l'activation de récepteurs AMPA et KA n'auraient pas de signification fonctionnelle. Cependant, lorsque la fréquence de décharge augmente (20-40 Hz), l'amplitude des événements inhibiteurs diminue et l'on observe une dépolarisation soutenue de la cellule pyramidale de CA3 (Mori et al., 2004). A cette fréquence on observe une dépression des synapses excitatrices sur les interneurons et des synapses inhibitrices sur les pyramides ce qui explique en partie le *switch* de l'inhibition vers l'excitation. A ces fréquences, le décours temporel des événements synaptiques excitateurs n'est plus raccourci par un événement inhibiteur di-synaptique et pourrait participer à la dépolarisation soutenue des cellules pyramidales de CA3 (Frerking and Ohligre-Frerking, 2002). Nos résultats montrant que les EPSC<sub>KA</sub>, avec leur cinétique lente, peuvent être activés dans ces conditions de faible libération de glutamate (comme lors de la décharge d'une seule cellule granulaire) permet d'envisager l'étude de leur rôle dans le *switch* dépendant de la fréquence observé au niveau des fibres moussues. Les cinétiques lentes des EPSC<sub>KA</sub> en association avec d'autres propriétés des synapses moussues telles que la *frequency facilitation* ou l'augmentation de la durée des potentiels d'action pré-synaptiques au cours d'un train de potentiels d'action (Geiger and Jonas, 2000) pourraient permettre d'expliquer la dépolarisation soutenue des cellules pyramidales de CA3 lorsque l'inhibition est réduite. Cette étude nécessitera la détermination des cinétiques des EPSP<sub>AMPA</sub> et EPSP<sub>KA</sub> qui peuvent sensiblement différer de celle des EPSC<sub>AMPA</sub> et EPSC<sub>KA</sub> notamment suite à l'activation de canaux voltages dépendants (Fricker and Miles, 2000). Nos résultats montrent également que les récepteurs KA post-synaptiques des cellules pyramidales de CA3 sont principalement co-activés avec les récepteurs AMPA au niveau des synapses moussues (contrairement au récepteurs KA post-synaptiques sur les interneurons). Des travaux récents montrant que la

quantité de récepteurs AMPA et KA présents au niveau post-synaptique peut être rapidement et différenciellement régulés par des protéines spécifiques (Hirbec et al., 2003) permet de penser que leur contribution relative à l'EPSC<sub>AMPA/KA</sub> pourraient également varier dans différentes conditions physiologiques et/ou pathologiques (Kidd and Isaac, 1999).

#### *Au niveau des interneurones dans la région CA1*

Comme nous l'avons vu, une particularité de la transmission synaptique due à l'activation des récepteurs KA par rapport à la transmission synaptique due à l'activation des récepteurs AMPA est qu'elle n'est observée que dans certains types cellulaires et dans ces types cellulaires au niveau de certaines synapses. Concernant les cellules principales de la formation hippocampique, la nature des types cellulaires et des synapses au niveau desquelles ces récepteurs post-synaptiques sont activés est bien connue (voir Fig. 30). Concernant les interneurones, cette connaissance est moins avancée. La grande variété de « types » d'interneurones et le fait que les afférences glutamatergiques puissent avoir une organisation laminaire moins précise à leur niveau rend cette tâche difficile. Les premiers travaux de Cossart et al., (1998) montrent que des stimulations des afférences synaptiques permettent de générer un courant au niveau de différentes classes d'interneurones identifiées morphologiquement (Cossart et al., 1998). Globalement des EPSC<sub>KA</sub> ont pu être évoqués dans 50% des interneurones de la région CA1 (14/26). Les principaux types d'interneurones au niveau desquels ces EPSC<sub>KA</sub> ont pu être évoqués sont les interneurones projetant au niveau du *stratum pyramidale* (3/4) et les O-LM (2/3). La possibilité d'enregistrer des mEPSC<sub>KA</sub> offre un moyen assez simple de déterminer quels interneurones expriment des récepteurs KA post-synaptiques et en quelle proportion ils participent à la transmission synaptique excitatrice dans ces cellules. Nos résultats, en accord avec les résultats de Cossart et ses collègues (1998), montrent que la plupart des interneurones de l'oriens de type O-LM ont des événements synaptiques KA dans la région CA1 et que ces événements peuvent être évoqués par des stimulations minimales dans l'oriens. Il est intéressant de noter qu'au niveau de ces interneurones, les mEPSC<sub>KA</sub> représentent la moitié des événements synaptiques excitateurs enregistrés (Cossart et al., 2002). Comme les O-LM sont principalement contactés par les récurrentes collatérales des cellules pyramidales de la région CA1 dans l'oriens (70% ; Blasco-Ibanez and Freund, 1995) celles-ci pourraient être la source des mEPSC<sub>KA</sub> enregistrés dans ces cellules. Un grand travail reste à effectuer pour déterminer dans quelle proportion les récepteurs KA post-synaptiques contribuent à la transmission synaptique excitatrice dans

d'autres types d'interneurones et au niveau de quelles synapses ces récepteurs sont préférentiellement activés. Cette étude nous paraît indispensable pour déterminer le rôle physiologique des récepteurs KA dans les interneurones. Dans un article récent, Pouille et Scanziani (2004) montrent que l'activation des cellules pyramidales de la région CA1 génère des événements synaptiques excitateurs ayant des cinétiques et des amplitudes différentes au niveau de deux types d'interneurones dans le stratum oriens de la région CA1. Alors que l'activation des cellules pyramidales de CA1 génère des événements ayant une cinétique lente et une amplitude faible au niveau des interneurones de type O-LM, elle génère des événements ayant une amplitude grande et une cinétique rapide au niveau des interneurones de types cellules en panier. De plus les synapses formées par les récurrentes collatérales de CA1 au niveau des O-LM expriment une facilitation de la transmission synaptique lorsqu'elles sont stimulées de façon répétitive alors que les synapses formées par ces mêmes récurrentes collatérales au niveau des interneurones de type cellule en panier expriment une dépression de la transmission synaptique. L'ensemble de ces propriétés fait qu'en réponse à un même train de potentiels d'action au niveau des récurrentes collatérales des cellules pyramidales de la région CA1, les interneurones de type cellule en panier déchargent au début de la stimulation puis s'arrêtent de décharger tandis que les interneurones de types O-LM déchargent plus tardivement mais plus durablement. Comme ces deux types d'interneurones contactent des domaines différents des cellules pyramidales de CA1, ces différents patterns d'activation pourraient avoir, en retour, des conséquences fonctionnelles différentes sur le fonctionnement des cellules pyramidales de CA1 (Miles et al., 1996). Nos résultats montrant que les récepteurs KA peuvent être activés par de faibles quantités de glutamate suggèrent la possibilité d'une sommation temporelle des EPSC<sub>KA</sub> à des fréquences de stimulation plus faibles que celles précédemment utilisées (100 Hz ; Castillo et al., 1997b). Les sommations des EPSC<sub>KA</sub> pourraient ainsi participer aux phénomènes de routage différentiel de l'information afférente décrits par Pouille et Scanziani.

Le déroulement temporel des événements synaptiques excitateurs intervient également dans la précision temporelle de l'émission d'un potentiel d'action (Fricker and Miles, 2000; Galarreta and Hestrin, 2001) et l'efficacité du transfert de l'information (London et al., 2002). Ainsi, le délai entre le début de l'événement synaptique excitateur et l'émission d'un potentiel d'action est beaucoup plus précis pour les événements ayant des cinétiques rapides en comparaison des événements ayant des cinétiques plus lentes. La cinétique des événements synaptiques excitateurs n'est pas seulement déterminée par les propriétés des synapses glutamatergiques ni par les propriétés des récepteurs ionotropiques glutamatergiques post-

synaptiques mais également par les propriétés intrinsèques des neurones dans lesquels ils sont générés. Les dendrites de différents types cellulaires renferment différents ensembles de canaux ioniques voltages dépendants. L'activation de ces canaux peut modifier directement la cinétique des événements synaptiques excitateurs en fonction du potentiel de membrane (Fricker and Miles, 2000). De futurs travaux permettront de déterminer si des différences en terme de précision de l'émission d'un potentiel d'action peuvent être observées après génération d'un EPSP<sub>AMPA</sub> et d'un EPSP<sub>KA</sub>.

Les récepteurs KA sont souvent associés à l'épilepsie du lobe temporel car des injections systémiques de KA peuvent provoquer des crises d'origine limbique. Dans une deuxième partie de mon projet de thèse nous nous sommes intéressés aux modifications de la transmission synaptique KA dans un modèle animal d'épilepsie du lobe temporal.

### 3. Plasticité post-lésionnelle des récepteurs kainate post-synaptiques

Les phénomènes de plasticité post-lésionnelle sont associés à de nombreux processus lésionnels. On les observe notamment après des lésions induites par excitotoxicité (Nadler et al., 1980), par ischémie focale (Zepeda et al., 2004), par le froid (Jacobs and Prince, 2005). Ces processus peuvent avoir un rôle régulateur mais conduisent souvent à une hyperexcitabilité cérébrale. Ils sont associés à la perte de synapses consécutive à la dégénérescence d'un certain nombre de neurones ainsi qu'à la formation de nouvelles synapses suite à des bourgeonnements axonaux et/ou dendritiques. De nombreuses études ont décrit des changements quantitatifs dans l'expression des sous-unités codant pour les récepteurs glutamatergiques et GABAergiques associés à ces remaniements. Dans les modèles animaux d'épilepsie du lobe temporel, la mort des interneurones est associée à une baisse de l'expression des sous-unités codant pour les récepteurs GABA<sub>A</sub> et le bourgeonnement des fibres myélinisées est associé à une augmentation de l'expression des récepteurs AMPA et NMDA. Parallèlement, les enregistrements électrophysiologiques rapportent une diminution de la fréquence des IPSCs spontanés et miniature associé à une augmentation de la fréquence des EPSCs. Au-delà de ces changements quantitatifs, des études plus récentes montrent que la nature des sous-unités exprimée peut également changer. Les récepteurs GABA<sub>A</sub> alors exprimés ont des profils pharmacologiques différents (pour revue voir Fritschy and Brunig, 2003). Nos résultats montrent que la transmission synaptique glutamatergique peut également être qualitativement modifiée dans un modèle animal d'épilepsie du lobe temporal. En effet, dans les cellules granulaires de rats contrôles toute la transmission synaptique



glutamatergique repose sur l'activation de récepteurs post-synaptiques AMPA qui génère des événements ayant des cinétiques rapides. Au contraire, chez le rat épileptique chronique, 50% de l'activité glutamatergique repose sur l'activation de récepteurs KA qui génèrent des événements synaptiques ayant des cinétiques trois fois plus lentes.

### *Possibles mécanismes*

L'adressage post-synaptique de ces récepteurs semble conditionné par l'arrivée des fibres moussues récurrentes et non à des phénomènes de plasticité synaptique à court terme induite par le *status epilepticus*. En effet, 4 à 5 jours après le status epilepticus, lorsque les fibres moussues n'ont pas encore bourgeonné, aucun EPSC<sub>KA</sub> n'a pu être enregistré dans les cellules granulaires (voir Fig. 38). Le lien particulier entre les fibres moussues et les récepteurs KA est connu depuis les premières expériences de marquage autoradiographique montrant que le stratum lucidum est une des régions les plus enrichies en récepteurs KA à haute affinité. Des expériences ont par la suite montré que la destruction sélective des fibres moussues entraînait une disparition de ces sites à haute affinité (Represa et al., 1987). Des travaux plus récents ont montré que les récepteurs KA post-synaptiques étaient sélectivement situés au niveau des fibres moussues dans les cellules pyramidales de CA3 (Castillo et al., 1997b; Marchal and Mulle, 2004; Vignes and Collingridge, 1997), et nous avons montré que les EPSC<sub>AMPA/KA</sub> sont sélectivement générés par les fibres moussues dans les cellules pyramidales de CA3 (Cossart et al., 2002). L'adressage des récepteurs KA au niveau post-synaptique semble dépendre de mécanismes sélectifs de régulation encore mal connus. Des études récentes ont montré que la sortie du réticulum endoplasmique et l'adressage vers la membrane plasmique dépendaient de séquences de rétention/libération situées au niveau C-terminal des sous-unités formant les récepteurs KA. Le recrutement des récepteurs KA au niveau post-synaptique dépend de l'interactions des sous-unités avec un ensemble de protéines de la densité post-synaptique (PSD). Comme les autres récepteurs ionotropiques glutamatergiques, les récepteurs KA contiennent au niveau C-terminal un motif de liaison au domaine PDZ des protéines de la PSD. Des premiers travaux ont montré que les protéines de la famille PSD95/SAP90 étaient capable de se lier aux sous-unité des récepteurs KA et de la rassembler (Garcia et al., 1998; Mehta et al., 2001). Dans une autre étude, Hirbeck et al., (2002) ont isolé quatre protéines contenant des domaines PDZ et interagissant avec les récepteurs KA : PSD95, GRIP, PICK1 et la synténine. Aucune de ces protéines n'est spécifique des récepteurs KA par rapport aux récepteurs AMPA et parfois NMDA (Isaac et

al., 2004). Cependant l'utilisation de peptides susceptibles de perturber l'interaction des sous-unités GluR5-2b ou GluR6 avec les protéines à domaine PDZ entraîne une diminution rapide de l'amplitude des courants synaptiques dus à l'activation des récepteurs KA sans modifier l'amplitude des courants synaptiques dus à l'activation des récepteurs AMPA. Ces expériences suggèrent que, comme les récepteurs AMPA, la présence de récepteurs KA au niveau post-synaptique est dynamiquement régulée. Nos résultats permettent de penser qu'un message pré-synaptique provenant des fibres moussues pourrait induire l'adressage spécifique des récepteurs KA post-synaptiques au niveau de leur densité post-synaptique. Il serait intéressant de déterminer si le bourgeonnement d'autres voies glutamatergiques peut également induire l'adressage a-spécifique des récepteurs KA au niveau post-synaptique.

### *Récepteurs kainate et genèse d'activités épileptiformes dans le gyrus denté*

Un certain nombre de données permettent de penser que le réseau récurrent des fibres moussues intervient dans la physiopathologie des épilepsies du lobe temporel. Le décours temporel du bourgeonnement moussu est en effet corrélé avec le développement des crises spontanées observées dans les modèles animaux d'épilepsie du lobe temporal (Castillo et al., 1997b; Garcia et al., 1998; Marchal and Mulle, 2004; Wuarin and Dudek, 2001). De plus, le bourgeonnement moussu est associé à la possibilité d'évoquer des activités hypersynchrones de types épileptiformes dans le gyrus denté au niveau de tranches d'hippocampe d'animaux chroniquement épileptiques. Le bourgeonnement moussu a enfin été corrélé avec la sévérité des activités épileptiformes induites dans le gyrus denté d'hippocampes sclérosés obtenus après résection chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (Gabriel et al., 2004). Le bourgeonnement des fibres moussues est associé à une perte d'interneurones dans le gyrus denté d'animaux chroniquement épileptiques. Certaines études ont rapporté que le bourgeonnement moussu pouvait être un mécanisme compensatoire de la perte des interneurones en augmentant l'inhibition par une excitation accrue des interneurones résistants (Kotti et al., 1997; Sloviter, 1992). Même si de tels mécanismes compensatoires peuvent exister des études récentes montrent que la voie récurrente moussue contacte préférentiellement les cellules granulaires (Buckmaster et al., 2002). De plus l'enregistrement des cellules granulaires rapporte une diminution et non une augmentation de la fréquence des événements synaptiques inhibiteurs enregistrés (Kobayashi and Buckmaster, 2003; Shao and Dudek, 2005). Dans ce contexte d'inhibition réduite, le réseau récurrent des fibres moussues

pourrait permettre la synchronisation de l'activité des cellules granulaires. Des mécanismes de synchronisation similaires ont en effet été décrits au niveau des cellules pyramidales de la région CA3 par activation du réseau des fibres récurrentes associatives/commissurales lorsque l'inhibition est réduite (Miles and Wong, 1987). A ce niveau (comme dans les réseaux en développement) la synchronisation est un phénomène dépendant de la fréquence qui interviendrait via la sommation temporelle des événements synaptique excitateurs (Chamberlin et al., 1990; Menendez and Sanchez-Andres, 2000). Les EPSC<sub>KA</sub> avec leur cinétique lente pourraient intervenir dans ce mécanisme de sommation temporelle. Nos résultats montrant que l'antagonisme fonctionnel des récepteurs KA diminue l'amplitude des activités synchrones et que la fréquence des EPSC<sub>KA</sub> est augmentée avant les activités synchrones sont en accord avec cette hypothèse (Epsztein et al., 2005). Cependant, comme au niveau des synapses mossues dans l'hippocampe de rat contrôle de nombreux autres processus tels que des modifications des propriétés intrinsèques des neurones (Shah et al., 2004; Bernard et al., 2004), des modifications de l'inhibition *feedback* (Kobayashi and Buckmaster, 2003), des mécanismes de *frequency facilitation* pourraient diminuer ou au contraire amplifier ce phénomène. Des expériences complémentaires révèlent une augmentation globale de l'amplitude des courants induits par application de KA dans le bain au niveau des cellules granulaires de rat épileptiques chroniques (voir Fig. 36). Ce résultat suggère que des récepteurs KA péri- et ou extra-synaptique sont exprimés dans les cellules granulaires de rat contrôles. Ce résultat montre également que l'adressage de récepteurs à au niveau post-synaptique augmente significativement le nombre total de récepteurs KA exprimés au niveau de la membrane plasmique chez les rats chroniquement épileptique. Les conséquences de cette augmentation notamment en terme de modification à long terme de l'excitabilité cellulaire intrinsèque restent à tester.

En conclusion, l'ensemble de nos travaux permet d'envisager l'étude du rôle des récepteurs kainate dans la transmission synaptique dans des conditions d'activation physiologiques du réseau hippocampique. Nos résultats permettent également de penser que la plasticité post-lésionnelle des synapses activant les récepteurs kainate, que nous avons mis en évidence pour la première fois, pourrait avoir des conséquences pathologiques. De futurs travaux diront dans quelle mesure ces observations peuvent être généralisées à d'autres régions cérébrales où les récepteurs kainate sont exprimés et qui expriment des phénomènes de plasticité post-lésionnelle dans différentes pathologies.

## Références Bibliographiques

- Acsady L, Arabadzisz D, Freund TF (1996a) Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience* 73: 299-315.
- Acsady L, Gorcs TJ, Freund TF (1996b) Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 73: 317-334.
- Acsady L, Kamondi A, Sik A, Freund T, Buzsaki G (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci* 18: 3386-3403.
- Agrawal SG, Evans RH (1986) The primary afferent depolarizing action of kainate in the rat. *Br J Pharmacol* 87: 345-355.
- Ali AB, Deuchars J, Pawelzik H, Thomson AM (1998) CA1 pyramidal to basket and bistratified cell EPSPs: dual intracellular recordings in rat hippocampal slices. *Journal of Physiology-London* 507: 201-217.
- Ali AB, Thomson AM (1998) Facilitating pyramid to horizontal oriens-alveus interneurone inputs: dual intracellular recordings in slices of rat hippocampus. *J Physiol* 507 ( Pt 1): 185-199.
- Alt A, Weiss B, Ogden AM, Knauss JL, Oler J, Ho K, Large TH, Bleakman D (2004) Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology* 46: 793-806.
- Amaral DG (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182: 851-914.
- Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195: 51-86.
- Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1-14.
- Andre V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM (2001) Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11: 452-468.
- Aniksztejn L, Bregestovski P, Ben Ari Y (1991) Selective activation of quisqualate metabotropic receptor potentiates NMDA but not AMPA responses. *Eur J Pharmacol* 205: 327-328.
- Aniksztejn L, Demarque M, Morozov Y, Ben Ari Y, Represa A (2001) Recurrent CA1 collateral axons in developing rat hippocampus. *Brain Res* 913: 195-200.

- Aniksztejn L, Otani S, Ben Ari Y (1992) Quisqualate Metabotropic Receptors Modulate NMDA Currents and Facilitate Induction of Long-Term Potentiation Through Protein Kinase C. *Eur J Neurosci* 4: 500-505.
- Armstrong N, Gouaux E (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 28: 165-181.
- Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E (1998) Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395: 913-917.
- Ascher P, Nowak L (1988) The Role of Divalent-Cations in the N-Methyl-D-Aspartate Responses of Mouse Central Neurons in Culture. *Journal of Physiology-London* 399: 247-266.
- Ayalon G, Stern-Bach Y (2001) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31: 103-113.
- Babb TL, Brown WJ, Pretorius J, Davenport C, Lieb JP, Crandall PH (1984) Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 25: 729-740.
- Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF (1991) Synaptic Reorganization by Mossy Fibers in Human Epileptic Fascia-Dentata. *Neuroscience* 42: 351-363.
- Babb TL, Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Yeoman KM, Kuhlman PA (1996) Glutamate AMPA receptors in the fascia dentata of human and kainate rat hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* 26: 193-205.
- Bahn S, Volk B, Wisden W (1994) Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J Neurosci* 14: 5525-5547.
- Bartolomei F, Wendling F, Regis J, Gavaret M, Guye M, Chauvel P (2004) Pre-ictal synchronicity in limbic networks of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 61: 89-104.
- Beach RL, Bathgate SL, Cotman CW (1982) Identification of cell types in rat hippocampal slices maintained in organotypic cultures. *Brain Res* 255: 3-20.
- Bellocchio EE, Hu H, Pohorille A, Chan J, Pickel VM, Edwards RH (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci* 18: 8648-8659.
- Ben Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* 3: 728-739.
- Ben Ari Y, Aniksztejn L, Bregestovski P (1992) Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. *Trends Neurosci* 15: 333-339.
- Ben Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416: 303-325.

Ben Ari Y, Cossart R (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends in Neurosciences* 23: 580-587.

Ben Ari Y, Gho M (1988) Long-lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurones induced by kainic acid. *J Physiol* 404: 365-384.

Ben Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal LS (1979) A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res* 163: 176-179.

Ben Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R (1981) Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6: 1361-1391.

Ben Ari Y (1985) Limbic Seizure and Brain-Damage Produced by Kainic Acid - Mechanisms and Relevance to Human Temporal-Lobe Epilepsy. *Neuroscience* 14: 375-403.

Benfenati F, Valtorta F, Rubenstein JL, Gorelick FS, Greengard P, Czernik AJ (1992) Synaptic vesicle-associated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature* 359: 417-420.

Berger ML, Lefauconnier JM, Tremblay E, Ben Ari Y (1986) Limbic seizures induced by systemically applied kainic acid: how much kainic acid reaches the brain? *Adv Exp Med Biol* 203: 199-209.

Bernard A, Ferhat L, Dessi F, Charton G, Represa A, Ben Ari Y, Khrestchatisky M (1999) Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent developmental, pathological and cellular regulation. *Eur J Neurosci* 11: 604-616.

Bernard A, Khrestchatisky M (1994) Assessing the extent of RNA editing in the TMII regions of GluR5 and GluR6 kainate receptors during rat brain development. *J Neurochem* 62: 2057-2060.

Bernard C, Anderson A, Becker A, Poolos NP, Beck H, Johnston D (2004) Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* 305: 532-535.

Best N, Mitchell J, Baimbridge KG, Wheal HV (1993) Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci Lett* 155: 1-6.

Best N, Mitchell J, Wheal HV (1994) Ultrastructure of parvalbumin-immunoreactive neurons in the CA1 area of the rat hippocampus following a kainic acid injection. *Acta Neuropathol (Berl)* 87: 187-195.

Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann S (1990) Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* 5: 583-595.

Bettler B, Egebjerg J, Sharma G, Pecht G, Hermans-Borgmeyer I, Moll C, Stevens CF, Heinemann S (1992) Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. *Neuron* 8: 257-265.

Birks RI, MACINTOSH FC (1957) Acetylcholine metabolism at nerve-endings. *Br Med Bull* 13: 157-161.

Bischofberger J, Jonas P (2002) TwoB or not twoB: differential transmission at glutamatergic mossy fiber-interneuron synapses in the hippocampus. *Trends Neurosci* 25: 600-603.

BLACKSTAD TW, KJAERHEIM A (1961) Special axo-dendritic synapses in the hippocampal cortex: electron and light microscopic studies on the layer of mossy fibers. *J Comp Neurol* 117: 133-159.

Blasco-Ibanez JM, Freund TF (1995) Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feed-back activation. *Eur J Neurosci* 7: 2170-2180.

Bleakman D (1999) Kainate receptor pharmacology and physiology. *Cell Mol Life Sci* 56: 558-566.

Blumcke I, Suter B, Behle K, Kuhn R, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD (2000) Loss of hilar mossy cells in Ammon's horn sclerosis. *Epilepsia* 41 Suppl 6: S174-S180.

Bortolotto ZA, Clarke VR, Delany CM, Parry MC, Smolders I, Vignes M, Ho KH, Miu P, Brinton BT, Fantaske R, Ogden A, Gates M, Ornstein PL, Lodge D, Bleakman D, Collingridge GL (1999) Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* 402: 297-301.

Bouchet C. et Cazauviehl B. De l'épilepsie considérée dans ses rapports avec l'aliénation mentale (1825) *Archs Gen Medec Paris* 9, 510-542.

Bouilleret V, Loup F, Kiener T, Marescaux C, Fritschy JM (2000) Early loss of interneurons and delayed subunit-specific changes in GABA(A)-receptor expression in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 10: 305-324.

Boulter J, Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C, Heinemann S (1990) Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. *Science* 249: 1033-1037.

Bowie D (2002) External anions and cations distinguish between AMPA and kainate receptor gating mechanisms. *J Physiol* 539: 725-733.

Bowie D, Garcia EP, Marshall J, Traynelis SF, Lange GD (2003) Allosteric regulation and spatial distribution of kainate receptors bound to ancillary proteins. *J Physiol* 547: 373-385.

Bowie D, Lange GD (2002) Functional stoichiometry of glutamate receptor desensitization. *J Neurosci* 22: 3392-3403.

Bowie D, Lange GD, Mayer ML (1998) Activity-dependent modulation of glutamate receptors by polyamines. *J Neurosci* 18: 8175-8185.

Braga MF, Aroniadou-Anderjaska V, Xie J, Li H (2003) Bidirectional modulation of GABA release by presynaptic glutamate receptor 5 kainate receptors in the basolateral amygdala. *J Neurosci* 23: 442-452.

Bragin A, Engel J, Jr., Wilson CL, Fried I, Mathern GW (1999) Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100--500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid--treated rats with chronic seizures. *Epilepsia* 40: 127-137.

Broer S, Brookes N (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 77: 705-719.

Buckmaster PS, Dudek FE (1999) In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. *Journal of Neurophysiology* 81: 712-721.

Buckmaster PS, Jongen-Relo AL (1999) Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats. *Journal of Neuroscience* 19: 9519-9529.

Buckmaster PS, Wenzel HJ, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1996) Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *J Comp Neurol* 366: 271-292.

Buckmaster PS, Zhang GF, Yamawaki R (2002) Axon sprouting in a model of temporal lobe epilepsy creates a predominantly excitatory feedback circuit. *Journal of Neuroscience* 22: 6650-6658.

Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994a) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368: 823-828.

Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P (1994b) Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 71: 1289-1307.

Bureau I, Bischoff S, Heinemann SF, Mulle C (1999) Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J Neurosci* 19: 653-663.

Bureau I, Dieudonne S, Coussen F, Mulle C (2000) Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 6838-6843.

Burger PM, Mehl E, Cameron PL, Maycox PR, Baumert M, Lottspeich F, De Camilli P, Jahn R (1989) Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron* 3: 715-720.

Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8: 189-198.

Burnashev N, Villarroel A, Sakmann B (1996) Dimensions and ion selectivity of recombinant AMPA and kainate receptor channels and their dependence on Q/R site residues. *J Physiol* 496 ( Pt 1): 165-173.

Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 485 ( Pt 2): 403-418.



- Caffe AR, van Leeuwen FW, Luiten PG (1987) Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *J Comp Neurol* 261: 237-252.
- Carter AG, Vogt KE, Foster KA, Regehr WG (2002) Assessing the role of calcium-induced calcium release in short-term presynaptic plasticity at excitatory central synapses. *J Neurosci* 22: 21-28.
- Cartmell J, Schoepp DD (2000) Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem* 75: 889-907.
- Casassus G, Mulle C (2002) Functional characterization of kainate receptors in the mouse nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 42: 603-611.
- Castillo PE, Janz R, Sudhof TC, Tzounopoulos T, Malenka RC, Nicoll RA (1997a) Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 388: 590-593.
- Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA (1997b) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388: 182-186.
- Cathala L, Holderith NB, Nusser Z, DiGregorio DA, Cull-Candy SG (2005) Changes in synaptic structure underlie the developmental speeding of AMPA receptor-mediated EPSCs. *Nat Neurosci* 8: 1310-1318.
- Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal LS (1982) Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 53: 581-589.
- Cavazos JE, Zhang P, Qazi R, Sutula TP (2003) Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. *J Comp Neurol* 458: 272-292.
- Ceccarelli B, Hurlbut WP (1980) Vesicle hypothesis of the release of quanta of acetylcholine. *Physiol Rev* 60: 396-441.
- Chamberlin NL, Traub RD, Dingledine R (1990) Role of Epsps in Initiation of Spontaneous Synchronized Burst Firing in Rat Hippocampal-Neurons Bathed in High Potassium. *Journal of Neurophysiology* 64: 1000-1008.
- Charpak S, Gahwiler BH, Do KQ, Knopfel T (1990) Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature* 347: 765-767.
- Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren CM, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15: 711-720.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Edwards RH (2002) The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J Cell Biol* 157: 349-355.
- Chen GQ, Cui C, Mayer ML, Gouaux E (1999) Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* 402: 817-821.
- Chergui K, Bouron A, Normand E, Mulle C (2000) Functional GluR6 kainate receptors in the striatum: indirect downregulation of synaptic transmission. *J Neurosci* 20: 2175-2182.

- Cherubini E, De Feo MR, Mecarelli O, Ricci GF (1983) Behavioral and electrographic patterns induced by systemic administration of kainic acid in developing rats. *Brain Res* 285: 69-77.
- Cherubini E, Rovira C, Ben Ari Y, Nistri A (1990) Effects of kainate on the excitability of rat hippocampal neurones. *Epilepsy Res* 5: 18-27.
- Chi P, Greengard P, Ryan TA (2003) Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron* 38: 69-78.
- Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, Barnes JM, Collingridge GL, Henley JM (1996) Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 379: 78-81.
- Cho K, Francis JC, Hirbec H, Dev K, Brown MW, Henley JM, Bashir ZI (2003) Regulation of kainate receptors by protein kinase C and metabotropic glutamate receptors. *J Physiol* 548: 723-730.
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7: 369-379.
- Christensen JK, Paternain AV, Selak S, Ahring PK, Lerma J (2004) A mosaic of functional kainate receptors in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 24: 8986-8993.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 246: 435-458.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1990) Quantitative, 3-Dimensional Analysis of Granule Cell Dendrites in the Rat Dentate Gyrus. *Journal of Comparative Neurology* 302: 206-219.
- Clarke VR, Ballyk BA, Hoo KH, Mandelzys A, Pellizzari A, Bath CP, Thomas J, Sharpe EF, Davies CH, Ornstein PL, Schoepp DD, Kamboj RK, Collingridge GL, Lodge D, Bleakman D (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature* 389: 599-603.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R (2002) On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 298: 1418-1421.
- Cohen I, Navarro V, Le Duigou C, Miles R (2003) Mesial temporal lobe epilepsy: a pathological replay of developmental mechanisms? *Biol Cell* 95: 329-333.
- Collin T, Marty A, Llano I (2005) Presynaptic calcium stores and synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* 15: 275-281.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 334: 33-46.
- Congar P, Leinekugel X, Ben Ari Y, Crepel V (1997) A long-lasting calcium-activated nonselective cationic current is generated by synaptic stimulation or exogenous activation of group I metabotropic glutamate receptors in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 17: 5366-5379.

- Contractor A, Sailer AW, Darstein M, Maron C, Xu J, Swanson GT, Heinemann SF (2003) Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation of mossy-fiber synapses in KA2(-/-) mice. *Journal of Neuroscience* 23: 422-429.
- Contractor A, Swanson G, Heinemann SF (2001) Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 29: 209-216.
- Contractor A, Swanson GT, Sailer A, O'Gorman S, Heinemann SF (2000) Identification of the kainate receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 20: 8269-8278.
- Cossart R, Bernard C, Ben Ari Y (2005) Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* 28: 108-115.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, De Felipe J, Ben Ari Y, Esclapez M, Bernard C (2001a) Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 4: 52-62.
- Cossart R, Epsztein J, Tyzio R, Becq H, Hirsch J, Ben Ari Y, Crepel V (2002) Quantal release of glutamate generates pure kainate and mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons. *Neuron* 35: 147-159.
- Cossart R, Esclapez M, Hirsch JC, Bernard C, Ben Ari Y (1998) GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1: 470-478.
- Cossart R, Tyzio R, Dinocourt C, Esclapez M, Hirsch JC, Ben Ari Y, Bernard C (2001b) Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron* 29: 497-508.
- Coussen F, Normand E, Marchal C, Costet P, Choquet D, Lambert M, Mege RM, Mulle C (2002) Recruitment of the kainate receptor subunit glutamate receptor 6 by cadherin/catenin complexes. *J Neurosci* 22: 6426-6436.
- Coussen F, Perrais D, Jaskolski F, Sachidhanandam S, Normand E, Bockaert J, Marin P, Mulle C (2005) Co-assembly of two GluR6 kainate receptor splice variants within a functional protein complex. *Neuron* 47: 555-566.
- Covolan L, Ribeiro LT, Longo BM, Mello LE (2000) Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus* 10: 169-180.
- Coyle JT (1983) Neurotoxic action of kainic acid. *J Neurochem* 41: 1-11.
- Coyle JT, Molliver ME, Kuhar MJ (1978) In situ injection of kainic acid: a new method for selectively lesioning neural cell bodies while sparing axons of passage. *J Comp Neurol* 180: 301-323.
- Crepel V, Aniksztejn L, Ben Ari Y, Hammond C (1994) Glutamate metabotropic receptors increase a Ca(2+)-activated nonspecific cationic current in CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 72: 1561-1569.

- Cronin J, Dudek FE (1988) Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats. *Brain Res* 474: 181-184.
- Crowder TL, Weiner JL (2002) Functional characterization of kainate receptors in the rat nucleus accumbens core region. *J Neurophysiol* 88: 41-48.
- Cui CH, Mayer ML (1999) Heteromeric kainate receptors formed by the coassembly of GluR5, GluR6, and GluR7. *Journal of Neuroscience* 19: 8281-8291.
- CURTIS DR, WATKINS JC (1960) The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* 6: 117-141.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65: 1-105.
- Darstein M, Petralia RS, Swanson GT, Wenthold RJ, Heinemann SF (2003) Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience* 23: 8013-8019.
- Davies J, Evans RH, Francis AA, WATKINS JC (1979) Excitatory amino acid receptors and synaptic excitation in the mammalian central nervous system. *J Physiol (Paris)* 75: 641-654.
- de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD (1989) Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 495: 387-395.
- Debonnel G, Weiss M, de Montigny C (1989) Reduced neuroexcitatory effect of domoic acid following mossy fiber denervation of the rat dorsal hippocampus: further evidence that toxicity of domoic acid involves kainate receptor activation. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 904-908.
- DEL CASTILLO J, KATZ B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124: 560-573.
- Delaney AJ, Jahr CE (2002) Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron* 36: 475-482.
- Demarque M, Villeneuve N, Manent JB, Becq H, Represa A, Ben Ari Y, Aniksztejn L (2004) Glutamate transporters prevent the generation of seizures in the developing rat neocortex. *J Neurosci* 24: 3289-3294.
- DeVries SH, Schwartz EA (1999) Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and "off" bipolar cells in a mammalian retina. *Nature* 397: 157-160.
- Dietrich D, Kirschstein T, Kukley M, Pereverzev A, von der BC, Schneider T, Beck H (2003) Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 39: 483-496.
- Dildy-Mayfield JE, Harris RA (1994) Activation of protein kinase C inhibits kainate-induced currents in oocytes expressing glutamate receptor subunits. *J Neurochem* 62: 1639-1642.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61.

- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben Ari Y, Esclapez M (2003) Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* 459: 407-425.
- Donevan SD, Beg A, Gunther JM, Twyman RE (1998) The methylglutamate, SYM 2081, is a potent and highly selective agonist at kainate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 539-545.
- Donevan SD, Rogawski MA (1993) GYKI 52466, a 2,3-benzodiazepine, is a highly selective, noncompetitive antagonist of AMPA/kainate receptor responses. *Neuron* 10: 51-59.
- Dudek FE, Shao LR (2003) Loss of GABAergic Interneurons in Seizure-induced Epileptogenesis. *Epilepsy Curr* 3: 159-161.
- Egebjerg J, Bettler B, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* 351: 745-748.
- Egebjerg J, Heinemann SF (1993) Ca<sup>2+</sup> permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 755-759.
- Eichenbaum H (2000) A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* 1: 41-50.
- El Bahh B, Lespinet V, Lurton D, Coussemacq M, Le Gal LS, Rougier A (1999) Correlations between granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and hippocampal cell loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 40: 1393-1401.
- Emptage NJ, Reid CA, Fine A (2001) Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 29: 197-208.
- Engel J, Jr. (2001) Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist* 7: 340-352.
- Engel J, Jr., Babb TL, Crandall PH (1989) Surgical treatment of epilepsy: opportunities for research into basic mechanisms of human brain function. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 46: 3-8.
- Engel J, Jr., Wolfson L, Brown L (1978) Anatomical correlates of electrical and behavioral events related to amygdaloid kindling. *Ann Neurol* 3: 538-544.
- Engel J, Pedley TA, Aicardi J (1997) *Epilepsy a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Epsztein J, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Crepel V (2005) Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J Neurosci*. Sep 7;25(36):8229-39.
- Everts I, Petroski R, Kizelsztejn P, Teichberg VI, Heinemann SF, Hollmann M (1999) Lectin-induced inhibition of desensitization of the kainate receptor GluR6 depends on the activation state and can be mediated by a single native or ectopic N-linked carbohydrate side chain. *J Neurosci* 19: 916-927.

Everts I, Villmann C, Hollmann M (1997) N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol* 52: 861-873.

Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23: 80-88.

FATT P, KATZ B (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117: 109-128.

Feng L, Molnar P, Nadler JV (2003) Short-term frequency-dependent plasticity at recurrent mossy fiber synapses of the epileptic brain. *Journal of Neuroscience* 23: 5381-5390.

Ferhat L, Esclapez M, Represa A, Fattoum A, Shirao T, Ben Ari Y (2003) Increased levels of acidic calponin during dendritic spine plasticity after pilocarpine-induced seizures. *Hippocampus* 13: 845-858.

Ferraguti F, Cobden P, Pollard M, Cope D, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P (2004) Immunolocalization of metabotropic glutamate receptor 1alpha (mGluR1alpha) in distinct classes of interneuron in the CA1 region of the rat hippocampus. *Hippocampus* 14: 193-215.

Ferraguti F, Conquet F, Corti C, Grandes P, Kuhn R, Knopfel T (1998) Immunohistochemical localization of the mGluR1beta metabotropic glutamate receptor in the adult rodent forebrain: evidence for a differential distribution of mGluR1 splice variants. *J Comp Neurol* 400: 391-407.

Fisahn A (2005) Kainate receptors and rhythmic activity in neuronal networks: hippocampal gamma oscillations as a tool. *J Physiol* 562: 65-72.

Fisahn A, Contractor A, Traub RD, Buhl EH, Heinemann SF, McBain CJ (2004) Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations. *J Neurosci* 24: 9658-9668.

Fisahn A, Heinemann SF, McBain CJ (2005) The kainate receptor subunit GluR6 mediates metabotropic regulation of the slow and medium AHP currents in mouse hippocampal neurones. *J Physiol* 562: 199-203.

Fisher RS, Alger BE (1984) Electrophysiological mechanisms of kainic acid-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* 4: 1312-1323.

Fitzjohn SM, Irving AJ, Palmer MJ, Harvey J, Lodge D, Collingridge GL (1996) Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 203: 211-213.

Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42: 1-11.

Forgacs M (2000) Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H(+)-ATPases. *J Exp Biol* 203: 71-80.

Foster AC, Mena EE, Monaghan DT, Cotman CW (1981) Synaptic localization of kainic acid binding sites. *Nature* 289: 73-75.

Franck JE, Pokorny J, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1995) Physiological and Morphologic Characteristics of Granule Cell Circuitry in Human Epileptic Hippocampus. *Epilepsia* 36: 543-558.

Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6: 119-130.

Freneau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH (2002) The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14488-14493.

Freneau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31: 247-260.

Freneau RT, Jr., Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27: 98-103.

Frerking M, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat Neurosci* 1: 479-486.

Frerking M, Nicoll RA (2000) Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 10: 342-351.

Frerking M, Ohligre-Frerking P (2002) AMPA receptors and kainate receptors encode different features of afferent activity. *Journal of Neuroscience* 22: 7434-7443.

Frerking M, Petersen CC, Nicoll RA (1999) Mechanisms underlying kainate receptor-mediated disinhibition in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12917-12922.

Frerking M, Schmitz D, Zhou Q, Johansen J, Nicoll RA (2001) Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3 -> CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *Journal of Neuroscience* 21: 2958-2966.

Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470.

Fricker D, Miles R (2000) EPSP amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons. *Neuron* 28: 559-569.

Fritschy JM, Brunig I (2003) Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther* 98: 299-323.

Frotscher M (1998) Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol* 8: 570-575.

Frotscher M, Kraft J, Zorn U (1988) Fine structure of identified neurons in the primate hippocampus: a combined Golgi/EM study in the baboon. *J Comp Neurol* 275: 254-270.

Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B (2000) Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience* 98: 41-53.

- Furukawa H, Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J* 22: 2873-2885.
- Gabriel S, Njunting M, Pomper JK, Merschhemke M, Sanabria ER, Eilers A, Kivi A, Zeller M, Meencke HJ, Cavalheiro EA, Heinemann U, Lehmann TN (2004) Stimulus and potassium-induced epileptiform activity in the human dentate gyrus from patients with and without hippocampal sclerosis. *J Neurosci* 24: 10416-10430.
- Gadea A, Lopez-Colome AM (2001) Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J Neurosci Res* 63: 453-460.
- Gaiarsa JL, Zagrean L, BenAri Y (1994) Neonatal Irradiation Prevents the Formation of Hippocampal Mossy Fibers and the Epileptic Action of Kainate on Rat CA3 Pyramidal Neurons. *Journal of Neurophysiology* 71: 204-215.
- Galarreta M, Hestrin S (2001) Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science* 292: 2295-2299.
- Ganter P, Szucs P, Paulsen O, Somogyi P (2004) Properties of horizontal axo-axonic cells in stratum oriens of the hippocampal CA1 area of rats in vitro. *Hippocampus* 14: 232-243.
- Garcia EP, Mehta S, Blair LAC, Wells DG, Shang J, Fukushima T, Fallon JR, Garner CC, Marshall J (1998) SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron* 21: 727-739.
- Gastaut H (1969) Classification of the epilepsies. Proposal for an international classification. *Epilepsia* 10: Suppl-21.
- Geiger JR, Jonas P (2000) Dynamic control of presynaptic  $Ca^{2+}$  inflow by fast-inactivating  $K^{+}$  channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* 28: 927-939.
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and  $Ca^{2+}$  permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15: 193-204.
- Geppert M, Bolshakov VY, Siegelbaum SA, Takei K, De Camilli P, Hammer RE, Sudhof TC (1994a) The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* 369: 493-497.
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Sudhof TC (1994b) Synaptotagmin I: a major  $Ca^{2+}$  sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79: 717-727.
- Geppert M, Goda Y, Stevens CF, Sudhof TC (1997) The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* 387: 810-814.
- Ghetti A, Heinemann SF (2000) NMDA-Dependent modulation of hippocampal kainate receptors by calcineurin and  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurosci* 20: 2766-2773.
- Gho M, King AE, Ben Ari Y, Cherubini E (1986) Kainate reduces two voltage-dependent potassium conductances in rat hippocampal neurons in vitro. *Brain Res* 385: 411-414.



- Gibb AJ, Colquhoun D (1991) Glutamate activation of a single NMDA receptor-channel produces a cluster of channel openings. *Proc Biol Sci* 243: 39-45.
- Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK (1969) A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 25: 295-330.
- Golgi C, Bentivoglio M, Swanson L (2001) On the fine structure of the pes Hippocampi major (with plates XIII-XXIII). 1886. *Brain Res Bull* 54: 461-483.
- Gonzalez L, Jr., Scheller RH (1999) Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell* 96: 755-758.
- Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH (2001) Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci* 13: 657-669.
- Gouaux E (2004) Structure and function of AMPA receptors. *J Physiol* 554: 249-253.
- GRAY EG (1963) Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *J Anat* 97: 101-106.
- Gregor P, O'Hara BF, Yang X, Uhl GR (1993) Expression and novel subunit isoforms of glutamate receptor genes GluR5 and GluR6. *Neuroreport* 4: 1343-1346.
- Guerineau NC, Bossu JL, Gahwiler BH, Gerber U (1995) Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* 15: 4395-4407.
- Guerineau NC, Gahwiler BH, Gerber U (1994) Reduction of resting K<sup>+</sup> current by metabotropic glutamate and muscarinic receptors in rat CA3 cells: mediation by G-proteins. *J Physiol* 474: 27-33.
- Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 16: 3397-3411.
- Gulyas AI, Hajos N, Katona I, Freund TF (2003) Interneurons are the local targets of hippocampal inhibitory cells which project to the medial septum. *Eur J Neurosci* 17: 1861-1872.
- Gulyas AI, Miettinen R, Jacobowitz DM, Freund TF (1992) Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neuroscience* 48: 1-27.
- Gulyas AI, Miles R, Hajos N, Freund TF (1993a) Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur J Neurosci* 5: 1729-1751.
- Gulyas AI, Miles R, Sik A, Toth K, Tamamaki N, Freund TF (1993b) Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature* 366: 683-687.

- Gulyas AI, Toth K, McBain CJ, Freund TF (1998) Stratum radiatum giant cells: a type of principal cell in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 10: 3813-3822.
- Halasy K, Buhl EH, Lorinczi Z, Tamas G, Somogyi P (1996) Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus* 6: 306-329.
- Hamberger A, Chiang GH, Sandoval E, Cotman CW (1979) Glutamate as a CNS transmitter. II. Regulation of synthesis in the releasable pool. *Brain Res* 168: 531-541.
- Heckmann M, Bufler J, Franke C, Dudel J (1996) Kinetics of homomeric GluR6 glutamate receptor channels. *Biophys J* 71: 1743-1750.
- Henkel AW, Simpson LL, Ridge RM, Betz WJ (1996) Synaptic vesicle movements monitored by fluorescence recovery after photobleaching in nerve terminals stained with FM1-43. *J Neurosci* 16: 3960-3967.
- Henze DA, Card JP, Barrionuevo G, Ben Ari Y (1997) Large amplitude miniature excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons are of mossy fiber origin. *J Neurophysiol* 77: 1075-1086.
- Henze DA, Urban NN, Barrionuevo G (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience* 98: 407-427.
- Henze DA, Wittner L, Buzsaki G (2002) Single granule cells reliably discharge targets in the hippocampal CA3 network in vivo. *Nature Neuroscience* 5: 790-795.
- Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH (1992) The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 8: 775-785.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 57: 417-428.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21: RC181.
- Heuser JE, Reese TS, Dennis MJ, Jan Y, Jan L, Evans L (1979) Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* 81: 275-300.
- Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P (1999) Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 269-279.
- Hirbec H, Francis JC, Lauri SE, Braithwaite SP, Coussen F, Mulle C, Dev KK, Coutinho V, Meyer G, Isaac JT, Collingridge GL, Henley JM (2003) Rapid and differential regulation of AMPA and kainate receptors at hippocampal mossy fibre synapses by PICK1 and GRIP. *Neuron* 37: 625-638.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.

- Hollmann M, Maron C, Heinemann S (1994) N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* 13: 1331-1343.
- Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342: 643-648.
- Hormuzdi SG, Pais I, LeBeau FE, Towers SK, Rozov A, Buhl EH, Whittington MA, Monyer H (2001) Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron* 31: 487-495.
- Houser CR, Esclapez M (1996) Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res* 26: 207-218.
- Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgadoescueta AV (1990) Altered Patterns of Dynorphin Immunoreactivity Suggest Mossy Fiber Reorganization in Human Hippocampal Epilepsy. *Journal of Neuroscience* 10: 267-282.
- Howe JR (1996) Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainate-type subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *J Neurophysiol* 76: 510-519.
- Huettner JE (1990) Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by Con A. *Neuron* 5: 255-266.
- Huettner JE (2003) Kainate receptors and synaptic transmission. *Progress in Neurobiology* 70: 387-407.
- Isaac JT, Mellor J, Hurtado D, Roche KW (2004) Kainate receptor trafficking: physiological roles and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther* 104: 163-172.
- Isokawa M (1998) Remodeling dendritic spines in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 258: 73-76.
- Isokawa M (2000) Remodeling dendritic spines of dentate granule cells in temporal lobe epilepsy patients and the rat pilocarpine model. *Epilepsia* 41 Suppl 6: S14-S17.
- Isokawa M, Levesque MF, Babb TL, Engel J (1993) Single Mossy Fiber Axonal Systems of Human Dentate Granule Cells Studied in Hippocampal Slices from Patients with Temporal-Lobe Epilepsy. *Journal of Neuroscience* 13: 1511-1522.
- Jacobs KM, Prince DA (2005) Excitatory and inhibitory postsynaptic currents in a rat model of epileptogenic microgyria. *J Neurophysiol* 93: 687-696.
- Jaskolski F, Coussen F, Mulle C (2005) Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26: 20-26.
- Jaskolski F, Coussen F, Nagarajan N, Normand E, Rosenmund C, Mulle C (2004) Subunit composition and alternative splicing regulate membrane delivery of kainate receptors. *J Neurosci* 24: 2506-2515.
- Jiang L, Xu J, Nedergaard M, Kang J (2001) A kainate receptor increases the efficacy of GABAergic synapses. *Neuron* 30: 503-513.

- Jin R, Banke TG, Mayer ML, Traynelis SF, Gouaux E (2003) Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 6: 803-810.
- Johansen TH, Drejer J, Watjen F, Nielsen EO (1993) A novel non-NMDA receptor antagonist shows selective displacement of low-affinity [<sup>3</sup>H]kainate binding. *Eur J Pharmacol* 246: 195-204.
- Jonas P (2000) The Time Course of Signaling at Central Glutamatergic Synapses. *News Physiol Sci* 15: 83-89.
- Jonas P, Bischofberger J, Fricker D, Miles R (2004) Interneuron Diversity series: Fast in, fast out--temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons. *Trends Neurosci* 27: 30-40.
- Jonas P, Major G, Sakmann B (1993) Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J Physiol* 472: 615-663.
- Jones KA, Wilding TJ, Huettner JE, Costa AM (1997) Desensitization of kainate receptors by kainate, glutamate and diastereomers of 4-methylglutamate. *Neuropharmacology* 36: 853-863.
- Jung MW, Mcnaughton BL (1993) Spatial Selectivity of Unit-Activity in the Hippocampal Granular Layer. *Hippocampus* 3: 165-182.
- Kamiya H, Ozawa S (1998) Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *J Physiol* 509 ( Pt 3): 833-845.
- Kamiya H, Ozawa S (2000) Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *J Physiol* 523 Pt 3: 653-665.
- Kamiya H, Ozawa S, Manabe T (2002) Kainate receptor-dependent short-term plasticity of presynaptic Ca<sup>2+</sup> influx at the hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 22: 9237-9243.
- Kamiya H, Shinozaki H, Yamamoto C (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *Journal of Physiology-London* 493: 447-455.
- Karlov V (2003) The new proposal on classification of epileptic seizures and epilepsy syndromes. *Epilepsia* 44: 732.
- Katona I, Acsady L, Freund TF (1999) Postsynaptic targets of somatostatin-immunoreactive interneurons in the rat hippocampus. *Neuroscience* 88: 37-55.
- KATZ B, Miledi R (1967) A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J Physiol* 192: 407-436.
- Kehl SJ, McLennan H, Collingridge GL (1984) Effects of folic and kainic acids on synaptic responses of hippocampal neurones. *Neuroscience* 11: 111-124.
- Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH (1990) A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249: 556-560.

Kerchner GA, Wang GD, Qiu CS, Huettner JE, Zhuo M (2001a) Direct presynaptic regulation of GABA/glycine release by kainate receptors in the dorsal horn: an ionotropic mechanism. *Neuron* 32: 477-488.

Kerchner GA, Wilding TJ, Huettner JE, Zhuo M (2002) Kainate receptor subunits underlying presynaptic regulation of transmitter release in the dorsal horn. *J Neurosci* 22: 8010-8017.

Kerchner GA, Wilding TJ, Li P, Zhuo M, Huettner JE (2001b) Presynaptic kainate receptors regulate spinal sensory transmission. *J Neurosci* 21: 59-66.

Khalilov I, Dzhalal V, Medina I, Leinekugel X, Melyan Z, Lamsa K, Khazipov R, Ben Ari Y (1999) Maturation of kainate-induced epileptiform activities in interconnected intact neonatal limbic structures in vitro. *Eur J Neurosci* 11: 3468-3480.

Kidd FL, Isaac JTR (1999) Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature* 400: 569-573.

Kidd FL, Isaac JTR (2001) Kinetics and activation of postsynaptic kainate receptors at thalamocortical synapses: Role of glutamate clearance. *Journal of Neurophysiology* 86: 1139-1148.

Kim JH, Guimaraes PO, Shen MY, Masukawa LM, Spencer DD (1990) Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 80: 41-45.

Kiskin NI, Krishtal OA, Tsyndrenko AY (1986) Excitatory amino acid receptors in hippocampal neurons: kainate fails to desensitize them. *Neurosci Lett* 63: 225-230.

Kobayashi M, Buckmaster PS (2003) Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience* 23: 2440-2452.

Koerner JF, Cotman CW (1981) Micromolar L-2-amino-4-phosphonobutyric acid selectively inhibits perforant path synapses from lateral entorhinal cortex. *Brain Res* 216: 192-198.

Kohler M, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1993) Determinants of Ca<sup>2+</sup> permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* 10: 491-500.

König P, Engel AK, Singer W (1996) Integrator or coincidence detector? The role of the cortical neuron revisited. *Trends Neurosci* 19: 130-137.

Kosofsky BE, Molliver ME (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1: 153-168.

Kotti T, Riekkinen PJ, Sr., Miettinen R (1997) Characterization of target cells for aberrant mossy fiber collaterals in the dentate gyrus of epileptic rat. *Exp Neurol* 146: 323-330.

Kraszewski K, Daniell L, Mundigl O, De Camilli P (1996) Mobility of synaptic vesicles in nerve endings monitored by recovery from photobleaching of synaptic vesicle-associated fluorescence. *J Neurosci* 16: 5905-5913.

- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9: 247-258.
- Laurberg S, Sorensen KE (1981) Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentatae and subfield CA3). *Brain Res* 212: 287-300.
- Lauri SE, Bortolotto ZA, Bleakman D, Ornstein PL, Lodge D, Isaac JTR, Collingridge GL (2001a) A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron* 32: 697-709.
- Lauri SE, Bortolotto ZA, Nistico R, Bleakman D, Ornstein PL, Lodge D, Isaac JT, Collingridge GL (2003) A role for Ca<sup>2+</sup> stores in kainate receptor-dependent synaptic facilitation and LTP at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 39: 327-341.
- Lauri SE, Delany C, VR JC, Bortolotto ZA, Ornstein PL, Isaac TR, Collingridge GL (2001b) Synaptic activation of a presynaptic kainate receptor facilitates AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal mossy fibre synapses. *Neuropharmacology* 41: 907-915.
- Lawrence JJ, McBain CJ (2003) Interneuron diversity series: containing the detonation--feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. *Trends Neurosci* 26: 631-640.
- Lee CJ, Kong H, Manzini MC, Albuquerque C, Chao MV, MacDermott AB (2001) Kainate receptors expressed by a subpopulation of developing nociceptors rapidly switch from high to low Ca<sup>2+</sup> permeability. *J Neurosci* 21: 4572-4581.
- Lei S, McBain CJ (2002) Distinct NMDA receptors provide differential modes of transmission at mossy fiber-interneuron synapses. *Neuron* 33: 921-933.
- Leranth C, Szeideemann Z, Hsu M, Buzsaki G (1996) AMPA receptors in the rat and primate hippocampus: a possible absence of GLUR2/3 subunits in most interneurons. *Neuroscience* 70: 631-652.
- Lerma J, Morales M, Vicente MA, Herreras O (1997) Glutamate receptors of the kainate type and synaptic transmission. *Trends in Neurosciences* 20: 9-12.
- Lerma J, Paternain AV, Rodriguez-Moreno A, Lopez-Garcia JC (2001) Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol Rev* 81: 971-998.
- Li H, Chen A, Xing G, Wei ML, Rogawski MA (2001) Kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation in the amygdala. *Nat Neurosci* 4: 612-620.
- Li H, Rogawski MA (1998) GluR5 kainate receptor mediated synaptic transmission in rat basolateral amygdala in vitro. *Neuropharmacology* 37: 1279-1286.
- Li P, Wilding TJ, Kim SJ, Calejesan AA, Huettner JE, Zhuo M (1999) Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature* 397: 161-164.
- Li XG, Somogyi P, Tepper JM, Buzsaki G (1992) Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Brain Res* 90: 519-525.

- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, Buzsaki G (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* 339: 181-208.
- Lidov HG, Grzanna R, Molliver ME (1980) The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat--an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 5: 207-227.
- Lim C, Blume HW, Madsen JR, Saper CB (1997) Connections of the hippocampal formation in humans: I. The mossy fiber pathway. *J Comp Neurol* 385: 325-351.
- Liu QS, Patrylo PR, Gao XB, van den Pol AN (1999) Kainate acts at presynaptic receptors to increase GABA release from hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 82: 1059-1062.
- Llano I, Gonzalez J, Caputo C, Lai FA, Blayney LM, Tan YP, Marty A (2000) Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat Neurosci* 3: 1256-1265.
- Llinas R, Steinberg IZ, Walton K (1981) Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* 33: 323-351.
- London ED, Coyle JT (1979) Specific binding of [3H]kainic acid to receptor sites in rat brain. *Mol Pharmacol* 15: 492-505.
- London M, Schreibman A, Hausser M, Larkum ME, Segev I (2002) The information efficacy of a synapse. *Nat Neurosci* 5: 332-340.
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH (1990) Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* 70: 453-511.
- Lorente de No R (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 46: 113-177.
- Lothman EW, Collins RC (1981) Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res* 218: 299-318.
- Loup F, Wieser HG, Yonekawa Y, Aguzzi A, Fritschy JM (2000) Selective alterations in GABAA receptor subtypes in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 20: 5401-5419.
- Loy R, Koziell DA, Lindsey JD, Moore RY (1980) Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 189: 699-710.
- Luebke JI, Dunlap K, Turner TJ (1993) Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron* 11: 895-902.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 8: 1488-1500.
- Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P (2000) Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 524 Pt 1: 91-116.

Macek TA, Winder DG, Gereau RW, Ladd CO, Conn PJ (1996) Differential involvement of group II and group III mGluRs as autoreceptors at lateral and medial perforant path synapses. *J Neurophysiol* 76: 3798-3806.

Mackler JM, Drummond JA, Loewen CA, Robinson IM, Reist NE (2002) The C(2)B Ca(2+)-binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature* 418: 340-344.

Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3: 91-101.

Magloczky Z, Acsady L, Freund TF (1994) Principal cells are the postsynaptic targets of supramammillary afferents in the hippocampus of the rat. *Hippocampus* 4: 322-334.

Magloczky Z, Freund TF (1995) Delayed cell death in the contralateral hippocampus following kainate injection into the CA3 subfield. *Neuroscience* 66: 847-860.

Magloczky Z, Freund TF (2005) Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci* 28: 334-340.

Magloczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF (2000) Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 96: 7-25.

Marchal C, Mulle C (2004) Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *Journal of Physiology-London* 561: 27-37.

Margerison JH, Corsellis JA (1966) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* 89: 499-530.

Martinez A, Ruiz M, Soriano E (1999) Spiny calretinin-immunoreactive neurons in the hilus and CA3 region of the rat hippocampus: local axon circuits, synaptic connections, and glutamic acid decarboxylase 65/67 mRNA expression. *J Comp Neurol* 404: 438-448.

Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP (2002) Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res* 135: 237-251.

Mathern GW, Babb TL, Pretorius JK, Leite JP (1995a) Reactive synaptogenesis and neuron densities for neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the epileptogenic human fascia dentata. *J Neurosci* 15: 3990-4004.

Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK (1995b) The clinical-pathogenic mechanisms of hippocampal neuron loss and surgical outcomes in temporal lobe epilepsy. *Brain* 118 ( Pt 1): 105-118.

Mathern GW, Kuhlman PA, Mendoza D, Pretorius JK (1997) Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 199-212.



- Mathern GW, Pretorius JK, Babb TL (1995c) Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. *J Neurosurg* 82: 211-219.
- Mathern GW, Pretorius JK, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, Leite JP, Chimelli L, Born DE, Fried I, Sakamoto AC, Assirati JA, Peacock WJ, Ojemann GA, Adelson PD (1998a) Altered hippocampal kainate-receptor mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Neurobiol Dis* 5: 151-176.
- Mathern GW, Pretorius JK, Leite JP, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, Bertram EH, III (1998b) Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res* 32: 154-171.
- Mathern GW, Pretorius JK, Mendoza D, Lozada A, Kornblum HI (1998c) Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels correlate with aberrant fascia dentata mossy fiber sprouting in the pilocarpine model of spontaneous limbic epilepsy. *J Neurosci Res* 54: 734-753.
- Mayer ML (2005a) Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity. *Neuron* 45: 539-552.
- Mayer ML (2005b) Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 15: 282-288.
- Mayer ML, Vyklicky L, Jr. (1989) Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 1411-1415.
- Mcbain CJ, DiChiara TJ, Kauer JA (1994) Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci* 14: 4433-4445.
- Mehta S, Wu H, Garner CC, Marshall J (2001) Molecular mechanisms regulating the differential association of kainate receptor subunits with SAP90/PSD-95 and SAP97. *J Biol Chem* 276: 16092-16099.
- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34: 985-995.
- Melyan Z, Lancaster B, Wheal HV (2004) Metabotropic regulation of intrinsic excitability by synaptic activation of kainate receptors. *J Neurosci* 24: 4530-4534.
- Melyan Z, Wheal HV, Lancaster B (2002) Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. *Neuron* 34: 107-114.
- Menendez dIP, Sanchez-Andres JV (2000) Heterogeneous populations of cells mediate spontaneous synchronous bursting in the developing hippocampus through a frequency-dependent mechanism. *Neuroscience* 97: 227-241.
- Miles R, Poncer JC (1993) Metabotropic glutamate receptors mediate a post-tetanic excitation of guinea-pig hippocampal inhibitory neurones. *J Physiol* 463: 461-473.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16: 815-823.

Miles R, Wong RK (1983) Single neurones can initiate synchronized population discharge in the hippocampus. *Nature* 306: 371-373.

Miles R, Wong RKS (1987) Inhibitory Control of Local Excitatory Circuits in the Guinea-Pig Hippocampus. *Journal of Physiology-London* 388: 611-629.

Miller LD, Petrozzino JJ, Connor JA (1995) G protein-coupled receptors mediate a fast excitatory postsynaptic current in CA3 pyramidal neurons in hippocampal slices. *J Neurosci* 15: 8320-8330.

Min MY, Rusakov DA, Kullmann DM (1998) Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion. *Neuron* 21: 561-570.

Molnar P, Nadler JV (1999) Mossy fiber-granule cell synapses in the normal and epileptic rat dentate gyrus studied with minimal laser photostimulation. *Journal of Neurophysiology* 82: 1883-1894.

Monaghan DT, Cotman CW (1982) The distribution of [3H]kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res* 252: 91-100.

MONOD J, WYMAN J, CHANGEUX JP (1965) ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. *J Mol Biol* 12: 88-118.

Mori M, Abegg MH, Gahwiler BH, Gerber U (2004) A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature* 431: 453-456.

Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 73: 1-60.

Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC (1998) Selective loss of GABA neurons in area CA1 of the rat hippocampus after intraventricular kainate. *Epilepsy Res* 32: 363-369.

Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-37.

Morrison JH, Molliver ME, Grzanna R (1979) Noradrenergic innervation of cerebral cortex: widespread effects of local cortical lesions. *Science* 205: 313-316.

Mott DD, Washburn MS, Zhang S, Dingledine RJ (2003) Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines. *J Neurosci* 23: 1179-1188.

Moudy AM, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1993) Development of dopamine-beta-hydroxylase-positive fiber innervation of the rat hippocampus. *Synapse* 15: 307-318.

Mulle C, Sailer A, Perez-Otano I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, Maron C, Gage FH, Mann JR, Bettler B, Heinemann SF (1998) Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392: 601-605.

Mulle C, Sailer A, Swanson GT, Brana C, O'Gorman S, Bettler B, Heinemann SF (2000) Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 28: 475-484.

- Nadler JV (2003) The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochemical Research* 28: 1649-1658.
- Nadler JV, Perry BW, Cotman CW (1980) Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res* 182: 1-9.
- Nakanishi N, Shneider NA, Axel R (1990) A family of glutamate receptor genes: evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties. *Neuron* 5: 569-581.
- Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3: 748-755.
- Neher E (1998) Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20: 389-399.
- Nistri A, Cherubini E (1991) Depression of a sustained calcium current by kainate in rat hippocampal neurones in vitro. *J Physiol* 435: 465-481.
- Nusser Z, Sieghart W, Benke D, Fritschy JM, Somogyi P (1996) Differential synaptic localization of two major gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha subunits on hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11939-11944.
- Nyiri G, Freund TF, Somogyi P (2001) Input-dependent synaptic targeting of alpha(2)-subunit-containing GABA(A) receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat. *Eur J Neurosci* 13: 428-442.
- Obenaus A, Esclapez M, Houser CR (1993) Loss of Glutamate-Decarboxylase Messenger-Rna Containing Neurons in the Rat Dentate Gyrus Following Pilocarpine-Induced Seizures. *Journal of Neuroscience* 13: 4470-4485.
- Okazaki MM, Evenson DA, Nadler JV (1995) Hippocampal Mossy Fiber Sprouting and Synapse Formation After Status Epilepticus in Rats - Visualization After Retrograde Transport of Biocytin. *Journal of Comparative Neurology* 352: 515-534.
- Oleskevich S, Descarries L, Lacaille JC (1989) Quantified distribution of the noradrenaline innervation in the hippocampus of adult rat. *J Neurosci* 9: 3803-3815.
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292: 923-926.
- Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.
- Olney JW, Fuller T, de Gubareff T (1979) Acute dendrotoxic changes in the hippocampus of kainate treated rats. *Brain Res* 176: 91-100.

Olney JW, Rhee V, Ho OL (1974) Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res* 77: 507-512.

Panula P, Pirvola U, Auvinen S, Airaksinen MS (1989) Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 28: 585-610.

Parra P, Gulyas AI, Miles R (1998) How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron* 20: 983-993.

Partin KM, Patneau DK, Winters CA, Mayer ML, Buonanno A (1993) Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron* 11: 1069-1082.

Paschen W, Djuricic B (1995) Regional differences in the extent of RNA editing of the glutamate receptor subunits GluR2 and GluR6 in rat brain. *J Neurosci Methods* 56: 21-29.

Paternain AV, Herrera MT, Nieto MA, Lerma J (2000) GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. *Journal of Neuroscience* 20: 196-205.

Paternain AV, Morales M, Lerma J (1995) Selective Antagonism of Ampa Receptors Unmasks Kainate Receptor-Mediated Responses in Hippocampal-Neurons. *Neuron* 14: 185-189.

Paternain AV, Rodriguez-Moreno A, Villarroel A, Lerma J (1998) Activation and desensitization properties of native and recombinant kainate receptors. *Neuropharmacology* 37: 1249-1259.

Paternain AV, Vicente A, Nielsen EO, Lerma J (1996) Comparative antagonism of kainate-activated kainate and AMPA receptors in hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 8: 2129-2136.

Patneau DK, Mayer ML (1991) Kinetic analysis of interactions between kainate and AMPA: evidence for activation of a single receptor in mouse hippocampal neurons. *Neuron* 6: 785-798.

Pawelzik H, Bannister AP, Deuchars J, Ilia M, Thomson AM (1999) Modulation of bistratified cell IPSPs and basket cell IPSPs by pentobarbitone sodium, diazepam and Zn<sup>2+</sup>: dual recordings in slices of adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 11: 3552-3564.

Pawelzik H, Hughes DI, Thomson AM (2002) Physiological and morphological diversity of immunocytochemically defined parvalbumin- and cholecystokinin-positive interneurons in CA1 of the adult rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology* 443: 346-367.

Pawlu C, DiAntonio A, Heckmann M (2004) Postfusional control of quantal current shape. *Neuron* 42: 607-618.

Pelletier JC, Hesson DP, Jones KA, Costa AM (1996) Substituted 1,2-dihydrophthalazines: potent, selective, and noncompetitive inhibitors of the AMPA receptor. *J Med Chem* 39: 343-346.

Pemberton KE, Belcher SM, Ripellino JA, Howe JR (1998) High-affinity kainate-type ion channels in rat cerebellar granule cells. *J Physiol* 510 ( Pt 2): 401-420.

- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (1994) Histological and Ultrastructural-Localization of the Kainate Receptor Subunits, Ka2 and Glur6/7, in the Rat Nervous-System Using Selective Antipeptide Antibodies. *Journal of Comparative Neurology* 349: 85-110.
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The Metabotropic Glutamate Receptors - Structure and Functions. *Neuropharmacology* 34: 1-26.
- Pinel JP, Rovner LI (1978) Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. *Exp Neurol* 58: 190-202.
- Pollard H, Charriaud-Marlangue C, Cantagrel S, Represa A, Robain O, Moreau J, Ben Ari Y (1994) Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* 63: 7-18.
- Pouille F and Scanziani M (2004) Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus *Nature* 429: 717-723.
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281-294.
- Ramon y Cajal S (1911) *Histologie Du Système Nerveux de l'Homme et Des Vertébrés*, Maloine, Paris.
- Raymond LA, Blackstone CD, Huganir RL (1993) Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Nature* 361: 637-641.
- Regehr WG, Mintz IM (1994) Participation of multiple calcium channel types in transmission at single climbing fiber to Purkinje cell synapses. *Neuron* 12: 605-613.
- Reid CA, Clements JD, Bekkers JM (1997) Nonuniform distribution of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures. *J Neurosci* 17: 2738-2745.
- Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, McMahon HT, Sudhof TC, Brose N, Rosenmund C (2001) Complexins regulate a late step in Ca<sup>2+</sup>-dependent neurotransmitter release. *Cell* 104: 71-81.
- Ren Z, Riley NJ, Garcia EP, Sanders JM, Swanson GT, Marshall J (2003a) Multiple trafficking signals regulate kainate receptor KA2 subunit surface expression. *J Neurosci* 23: 6608-6616.
- Ren Z, Riley NJ, Needleman LA, Sanders JM, Swanson GT, Marshall J (2003b) Cell surface expression of GluR5 kainate receptors is regulated by an endoplasmic reticulum retention signal. *J Biol Chem* 278: 52700-52709.
- Represa A, Jorquera I, Lasalle GL, BenAri Y (1993) Epilepsy Induced Collateral Sprouting of Hippocampal Mossy Fibers - Does It Induce the Development of Ectopic Synapses with Granule Cell Dendrites. *Hippocampus* 3: 257-268.
- Represa A, Robain O, Tremblay E, Ben Ari Y (1989) Hippocampal plasticity in childhood epilepsy. *Neurosci Lett* 99: 351-355.

- Represa A, Tremblay E, BenAri Y (1987) Kainate Binding-Sites in the Hippocampal Mossy Fibers - Localization and Plasticity. *Neuroscience* 20: 739-748.
- Represa A, BenAri Y (1991) Synaptogénèse réactive des fibres moussues après épilepsie: répercussion sur les récepteurs au kainate. *Epilepsies* 1991; 213:223-232.
- Ribak CE, Peterson GM (1991) Intragranular mossy fibers in rats and gerbils form synapses with the somata and proximal dendrites of basket cells in the dentate gyrus. *Hippocampus* 1: 355-364.
- Ribak CE, Seress L, Amaral DG (1985) The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol* 14: 835-857.
- Rizo J, Sudhof TC (2002) Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3: 641-653.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2004) The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science* 303: 2037-2039.
- Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci* 6: 57-69.
- Robbins RJ, Brines ML, Kim JH, Adrian T, de Lanerolle N, Welsh S, Spencer DD (1991) A selective loss of somatostatin in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 29: 325-332.
- Robert A, Armstrong N, Gouaux JE, Howe JR (2005) AMPA receptor binding cleft mutations that alter affinity, efficacy, and recovery from desensitization. *J Neurosci* 25: 3752-3762.
- Robert A, Irizarry SN, Hughes TE, Howe JR (2001) Subunit interactions and AMPA receptor desensitization. *J Neurosci* 21: 5574-5586.
- Robinson IM, Ranjan R, Schwarz TL (2002) Synaptotagmins I and IV promote transmitter release independently of Ca(2+) binding in the C(2)A domain. *Nature* 418: 336-340.
- Robinson JH, Deadwyler SA (1981) Kainic acid produces depolarization of CA3 pyramidal cells in the vitro hippocampal slice. *Brain Res* 221: 117-127.
- Rodriguez-Moreno A, Herreras O, Lerma J (1997) Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 19: 893-901.
- Rodriguez-Moreno A, Lerma J (1998) Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* 20: 1211-1218.
- Rodriguez-Moreno A, Lopez-Garcia JC, Lerma J (2000) Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 1293-1298.
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280: 1596-1599.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a

major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686.

Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713-725.

Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes HM, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433: 73-77.

Ruano D, Lambolez B, Rossier J, Paternain AV, Lerma J (1995) Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing. *Neuron* 14: 1009-1017.

Salin PA, Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 13304-13309.

SANO K, MALAMUD N (1953) Clinical significance of sclerosis of the cornu ammonis: ictal psychic phenomena. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 70: 40-53.

Sansig G, Bushell TJ, Clarke VR, Rozov A, Burnashev N, Portet C, Gasparini F, Schmutz M, Klebs K, Shigemoto R, Flor PJ, Kuhn R, Knoepfel T, Schroeder M, Hampson DR, Collett VJ, Zhang C, Duvoisin RM, Collingridge GL, van Der PH (2001) Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J Neurosci* 21: 8734-8745.

Sayin U, Osting S, Hagen J, Rutecki P, Sutula T (2003) Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *J Neurosci* 23: 2759-2768.

Scanziani M, Salin PA, Vogt KE, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* 385: 630-634.

Scharfman HE (1994) Evidence from simultaneous intracellular recordings in rat hippocampal slices that area CA3 pyramidal cells innervate dentate hilar mossy cells. *J Neurophysiol* 72: 2167-2180.

Scharfman HE (1995) Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons. *J Neurophysiol* 74: 179-194.

Scharfman HE, Smith KL, Goodman JH, Sollas AL (2001) Survival of dentate hilar mossy cells after pilocarpine-induced seizures and their synchronized burst discharges with area CA3 pyramidal cells. *Neuroscience* 104: 741-759.

Scharfman HE, Sollas AL, Berger RE, Goodman JH (2003) Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting. *Journal of Neurophysiology* 90: 2536-2547.

- Schiffer HH, Swanson GT, Heinemann SF (1997) Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron* 19: 1141-1146.
- Schmitz D, Frerking M, Nicoll RA (2000) Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 27: 327-338.
- Schmitz D, Mellor J, Breustedt J, Nicoll RA (2003) Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Nature Neuroscience* 6: 1058-1063.
- Schmitz D, Mellor J, Frerking M, Nicoll RA (2001a) Presynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11003-11008.
- Schmitz D, Mellor J, Nicoll RA (2001b) Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* 291: 1972-1976.
- Schneggenburger R, Neher E (2005) Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Current Opinion in Neurobiology* 15: 266-274.
- Schoepp DD, Conn PJ (1993) Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 14: 13-20.
- Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M (1998) Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 51: 1256-1262.
- Semyanov A, Kullmann DM (2001) Kainate receptor-dependent axonal depolarization and action potential initiation in interneurons. *Nat Neurosci* 4: 718-723.
- Seress L (1988) Interspecies Comparison of the Hippocampal-Formation Shows Increased Emphasis on the Regio Superior in the Ammons Horn of the Human-Brain. *Journal fur Hirnforschung* 29: 335-340.
- Seress L, Mrzljak L (1987) Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampal formations. *Brain Res* 405: 169-174.
- Shah MM, Anderson AE, Leung V, Lin X, Johnston D (2004) Seizure-induced plasticity of h channels in entorhinal cortical layer III pyramidal neurons. *Neuron* 44: 495-508.
- Shao LR, Dudek FE (2005) Changes in mIPSCs and sIPSCs after kainate treatment: evidence for loss of inhibitory input to dentate granule cells and possible compensatory responses. *J Neurophysiol* 94: 952-960.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 7503-7522.



- Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1992) Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol* 322: 121-135.
- Shinozaki H, Konishi S (1970) Actions of several anthelmintics and insecticides on rat cortical neurones. *Brain Res* 24: 368-371.
- Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsaki G (1995) Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J Neurosci* 15: 6651-6665.
- Sik A, Tamamaki N, Freund TF (1993) Complete axon arborization of a single CA3 pyramidal cell in the rat hippocampus, and its relationship with postsynaptic parvalbumin-containing interneurons. *Eur J Neurosci* 5: 1719-1728.
- Simon JR, Contrera JF, Kuhar MJ (1976) Binding of [3H] kainic acid, and analogue of Lglutamate, to brain membranes. *J Neurochem* 26: 141-147.
- Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J, Weiss S (1985) Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317(6039):717-9.
- Sloviter RS (1987) Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235: 73-76.
- Sloviter RS (1992) Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. *Neurosci Lett* 137: 91-96.
- Sloviter RS, Damiano BP (1981) Sustained electrical stimulation of the perforant path duplicates kainate-induced electrophysiological effects and hippocampal damage in rats. *Neurosci Lett* 24: 279-284.
- Smith BN, Dudek FE (2001) Short- and long-term changes in CA1 network excitability after kainate treatment in rats. *J Neurophysiol* 85: 1-9.
- Smolders I, Bortolotto ZA, Clarke VR, Warre R, Khan GM, O'Neill MJ, Ornstein PL, Bleakman D, Ogden A, Weiss B, Stables JP, Ho KH, Ebinger G, Collingridge GL, Lodge D, Michotte Y (2002) Antagonists of GLU(K5)-containing kainate receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. *Nat Neurosci* 5: 796-804.
- Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinänen K, Sakmann B, Seeburg PH (1992) A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J* 11: 1651-1656.
- Sommer B, Kohler M, Sprengel R, Seeburg PH (1991) RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67: 11-19.
- Somogyi P (1977) A specific 'axo-axonal' interneuron in the visual cortex of the rat. *Brain Res* 136: 345-350.
- Somogyi P, Klausberger T (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562: 9-26.

Soriano E, Frotscher M (1993) Spiny nonpyramidal neurons in the CA3 region of the rat hippocampus are glutamate-like immunoreactive and receive convergent mossy fiber input. *J Comp Neurol* 333: 435-448.

Soriano E, Frotscher M (1994) Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus* 4: 65-69.

Spencer SS, Guimaraes P, Katz A, Kim J, Spencer D (1992) Morphological patterns of seizures recorded intracranially. *Epilepsia* 33: 537-545.

Sperk G, Marksteiner J, Gruber B, Bellmann R, Mahata M, Ortler M (1992) Functional changes in neuropeptide Y- and somatostatin-containing neurons induced by limbic seizures in the rat. *Neuroscience* 50: 831-846.

Spruston N, Lubke J, Frotscher M (1997) Interneurons in the stratum lucidum of the rat hippocampus: an anatomical and electrophysiological characterization. *J Comp Neurol* 385: 427-440.

Staba RJ, Wilson CL, Bragin A, Fried I, Engel J, Jr. (2002) Quantitative analysis of high-frequency oscillations (80-500 Hz) recorded in human epileptic hippocampus and entorhinal cortex. *J Neurophysiol* 88: 1743-1752.

Stanfield BB, Cowan WM (1984) An EM autoradiographic study of the hypothalamo-hippocampal projection. *Brain Res* 309: 299-307.

Stern P, Behe P, Schoepfer R, Colquhoun D (1992) Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc Biol Sci* 250: 271-277.

Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard PO, O'Hara PJ, Heinemann SF (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 13: 1345-1357.

Storm-Mathisen J, Leknes AK, Bore AT, Vaaland JL, Edminson P, Haug FM, Ottersen OP (1983) First visualization of glutamate and GABA in neurones by immunocytochemistry. *Nature* 301: 517-520.

Sugiyama H, Ito I, Hirono C (1987) A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325: 531-533.

Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2002) Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* 417: 245-253.

Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989) Mossy Fiber Synaptic Reorganization in the Epileptic Human Temporal-Lobe. *Annals of Neurology* 26: 321-330.

Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G (1988) Synaptic Reorganization in the Hippocampus Induced by Abnormal Functional-Activity. *Science* 239: 1147-1150.

Sutula T, Zhang P, Lynch M, Sayin U, Golarai G, Rod R (1998) Synaptic and axonal remodeling of mossy fibers in the hilus and supragranular region of the dentate gyrus in kainate-treated rats. *J Comp Neurol* 390: 578-594.

Suzuki F, Hirai H, Onteniente B, Riban V, Matsuda M, Kurokawa K (2000) Long-term increase of GluR2 alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptor subunit in the dispersed dentate gyrus after intrahippocampal kainate injection in the mouse. *Neuroscience* 101: 41-50.

Swanson GT, Feldmeyer D, Kaneda M, CullCandy SG (1996) Effect of RNA editing and subunit co-assembly on single-channel properties of recombinant kainate receptors. *Journal of Physiology-London* 492: 129-142.

Swanson GT, Gereau RW, Green T, Heinemann SF (1997a) Identification of amino acid residues that control functional behavior in GluR5 and GluR6 kainate receptors. *Neuron* 19: 913-926.

Swanson GT, Green T, Heinemann SF (1998) Kainate receptors exhibit differential sensitivities to (S)-5-iodowillardiine. *Mol Pharmacol* 53: 942-949.

Swanson GT, Green T, Sakai R, Contractor A, Che W, Kamiya H, Heinemann SF (2002) Differential activation of individual subunits in heteromeric kainate receptors. *Neuron* 34: 589-598.

Swanson GT, Heinemann SF (1998) Heterogeneity of homomeric GluR5 kainate receptor desensitization expressed in HEK293 cells. *J Physiol* 513 ( Pt 3): 639-646.

Swanson GT, Kamboj SK, Cull-Candy SG (1997b) Single-channel properties of recombinant AMPA receptors depend on RNA editing, splice variation, and subunit composition. *J Neurosci* 17: 58-69.

Swanson LW, Sawchenko PE, Cowan WM (1980) Evidence that the commissural, associational and septal projections of the regio inferior of the hippocampus arise from the same neurons. *Brain Res* 197: 207-212.

Szentagothai J, Arbib MA (1974) Conceptual models of neural organization. *Neurosci Res Program Bull* 12: 305-510.

Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366: 156-158.

Takechi H, Eilers J, Konnerth A (1998) A new class of synaptic response involving calcium release in dendritic spines. *Nature* 396: 757-760.

Tamamaki N, Nojyo Y (1990) Disposition of the slab-like modules formed by axon branches originating from single CA1 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 291: 509-519.

Tamamaki N, Watanabe K, Nojyo Y (1984) A whole image of the hippocampal pyramidal neuron revealed by intracellular pressure-injection of horseradish peroxidase. *Brain Res* 307: 336-340.

Tanabe Y, Nomura A, Masu M, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1993) Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. *J Neurosci* 13: 1372-1378.

- Tarnawa I, Vize ES (1998) 2,3-benzodiazepine AMPA antagonists. *Restor Neurol Neurosci* 13: 41-57.
- Tashiro A, Dunaevsky A, Blazeski R, Mason CA, Yuste R (2003) Bidirectional regulation of hippocampal mossy fiber filopodial motility by kainate receptors: a two-step model of synaptogenesis. *Neuron* 38: 773-784.
- Tauck DL, Nadler JV (1985) Evidence of Functional Mossy Fiber Sprouting in Hippocampal-Formation of Kainic Acid-Treated Rats. *Journal of Neuroscience* 5: 1016-1022.
- Thanki CM, Sugden D, Thomas AJ, Bradford HF (1983) In vivo release from cerebral cortex of [<sup>14</sup>C]glutamate synthesized from [U-<sup>14</sup>C]glutamine. *J Neurochem* 41: 611-617.
- Thomson AM, Bannister AP, Hughes DI, Pawelzik H (2000) Differential sensitivity to Zolpidem of IPSPs activated by morphologically identified CA1 interneurons in slices of rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 12: 425-436.
- Tork I (1990) Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* 600: 9-34.
- Torri TF, Bossi M, Fesce R, Greengard P, Valtorta F (1992) Synapsin I partially dissociates from synaptic vesicles during exocytosis induced by electrical stimulation. *Neuron* 9: 1143-1153.
- Toth K, McBain CJ (1998) Afferent-specific innervation of two distinct AMPA receptor subtypes on single hippocampal interneurons. *Nat Neurosci* 1: 572-578.
- Toth K, Soares G, Lawrence JJ, Tansey EP, McBain CJ (2000) Differential mechanisms of transmission at three types of mossy fiber synapse. *Journal of Neuroscience* 20: 8279-8289.
- Traynelis SF, Wahl P (1997) Control of rat GluR6 glutamate receptor open probability by protein kinase A and calcineurin. *J Physiol* 503 ( Pt 3): 513-531.
- Tremblay E, Ben Ari Y (1984) Usefulness of parenteral kainic acid as a model of temporal lobe epilepsy. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin* 14: 241-246.
- Tremblay E, Nitecka L, Berger ML, Ben Ari Y (1984) Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. I. Clinical, electrographic and metabolic observations. *Neuroscience* 13: 1051-1072.
- Tu B, Timofeeva O, Jiao Y, Nadler JV (2005) Spontaneous release of neuropeptide Y tonically inhibits recurrent mossy fiber synaptic transmission in epileptic brain. *J Neurosci* 25: 1718-1729.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315-335.
- van Hooft JA, Giuffrida R, Bлатow M, Monyer H (2000) Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors in functionally distinct hippocampal interneurons. *J Neurosci* 20: 3544-3551.

- Varoqui H, Schafer MK, Zhu H, Weihe E, Erickson JD (2002) Identification of the differentiation-associated Na<sup>+</sup>/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22: 142-155.
- Velasco AL, Wilson CL, Babb TL, Engel J, Jr. (2000) Functional and anatomic correlates of two frequently observed temporal lobe seizure-onset patterns. *Neural Plast* 7: 49-63.
- Venance L, Rozov A, Blatow M, Burnashev N, Feldmeyer D, Monyer H (2000) Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10260-10265.
- Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1991) Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252: 1715-1718.
- Verdoorn TA, Johansen TH, Drejer J, Nielsen EO (1994) Selective block of recombinant glur6 receptors by NS-102, a novel non-NMDA receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 269: 43-49.
- Verney C, Baulac M, Berger B, Alvarez C, Vigny A, Helle KB (1985) Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neuroscience* 14: 1039-1052.
- Vertes RP (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326: 595-622.
- Vida I, Frotscher M (2000) A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1275-1280.
- Vida I, Halasy K, Szinyei C, Somogyi P, Buhl EH (1998) Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *Journal of Physiology-London* 506: 755-773.
- Vignes M, Clarke VR, Parry MJ, Bleakman D, Lodge D, Ornstein PL, Collingridge GL (1998) The GluR5 subtype of kainate receptor regulates excitatory synaptic transmission in areas CA1 and CA3 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 37: 1269-1277.
- Vignes M, Collingridge GL (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388: 179-182.
- Wang LY, Taverna FA, Huang XP, MacDonald JF, Hampson DR (1993) Phosphorylation and modulation of a kainate receptor (GluR6) by cAMP-dependent protein kinase. *Science* 259: 1173-1175.
- WATKINS JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21: 165-204.
- WATKINS JC, Pook PC, Sunter DC, Davies J, Honore T (1990) Experiments with kainate and quisqualate agonists and antagonists in relation to the sub-classification of 'non-NMDA' receptors. *Adv Exp Med Biol* 268: 49-55.

- Wenzel HJ, Woolley CS, Robbins CA, Schwartzkroin PA (2000) Kainic acid-induced mossy fiber sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats. *Hippocampus* 10: 244-260.
- Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH (1991) Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351: 742-744.
- Westbrook GL, Lothman EW (1983) Cellular and synaptic basis of kainic acid-induced hippocampal epileptiform activity. *Brain Res* 273: 97-109.
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW (1994) Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264: 107-111.
- Wilding TJ, Huettner JE (1995) Differential Antagonism of Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isioxazolepropionic Acid-Preferring and Kainate-Preferring Receptors by 2,3-Benzodiazepines. *Molecular Pharmacology* 47: 582-587.
- Wilding TJ, Huettner JE (1997) Activation and desensitization of hippocampal kainate receptors. *Journal of Neuroscience* 17: 2713-2721.
- Wisden W, Seeburg PH (1993a) A Complex Mosaic of High-Affinity Kainate Receptors in Rat-Brain. *Journal of Neuroscience* 13: 3582-3598.
- Wisden W, Seeburg PH (1993b) Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 3: 291-298.
- Wittner L, Magloczky Z, Borhegyi Z, Halasz P, Toth S, Eross L, Szabo Z, Freund TF (2001) Preservation of perisomatic inhibitory input of granule cells in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 108: 587-600.
- Wong LA, Mayer ML (1993) Differential modulation by cyclothiazide and concanavalin A of desensitization at native alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid- and kainate-preferring glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 44: 504-510.
- Wong LA, Mayer ML, Jane DE, WATKINS JC (1994) Willardiines differentiate agonist binding sites for kainate- versus AMPA-preferring glutamate receptors in DRG and hippocampal neurons. *J Neurosci* 14: 3881-3897.
- Wuarin JP, Dudek FE (1996) Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated epileptic rats. *Journal of Neuroscience* 16: 4438-4448.
- Wuarin JP, Dudek FE (2001) Excitatory synaptic input to granule cells increases with time after kainate treatment. *Journal of Neurophysiology* 85: 1067-1077.
- Yan S, Sanders JM, Xu J, Zhu Y, Contractor A, Swanson GT (2004) A C-terminal determinant of GluR6 kainate receptor trafficking. *J Neurosci* 24: 679-691.
- Yoshino M, Sawada S, Yamamoto C, Kamiya H (1996) A metabotropic glutamate receptor agonist DCG-IV suppresses synaptic transmission at mossy fiber pathway of the guinea pig hippocampus. *Neurosci Lett* 207: 70-72.

Zepeda A, Sengpiel F, Guagnelli MA, Vaca L, Arias C (2004) Functional reorganization of visual cortex maps after ischemic lesions is accompanied by changes in expression of cytoskeletal proteins and NMDA and GABA(A) receptor subunits. *J Neurosci* 24: 1812-1821.

Zhang N, Houser CR (1999) Ultrastructural localization of dynorphin in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy: a study of reorganized mossy fiber synapses. *J Comp Neurol* 405: 472-490.

Zorumski CF, Yang J (1988) AMPA, kainate, and quisqualate activate a common receptor-channel complex on embryonic chick motoneurons. *J Neurosci* 8: 4277-4286.